



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Heidi Toivonen

# DNA-taltiointivälineiden vertailu

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

1.4.2020

Tekijä Otsikko	Heidi Toivonen DNA-taltiointivälineiden vertailu
Sivumäärä Aika	44 sivua 1.4.2020
Tutkinto	laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	rikoskemisti Minna Eriksson lehtori Tiina Soininen
<p>Opinnäytetyö tehtiin Keskusrikospoliisin Rikosteknisen laboratorion DNA-laboratoriossa Vantaan Jokiniemessä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata uusia DNA-näytteiden taltiointivälineitä ja verrata niitä nykyisin käytössä olevaan pumpulipuikkoon. Tavoitteena oli testata, onko markkinoilla tällä hetkellä saatavilla tehokkaampia taltiointivälineitä, joilla taltioinnin pystyisi suorittamaan yksinkertaisemmin ja nopeammin.</p> <p>Testaukseen valittiin kaksi taltiointiteippiä sekä erilaisia katkaistavia taltiointipuikkoja. Taltiointivälineitä verrattiin taltioimalla DNA-näytteitä erilaisilta näytemateriaaleilta. DNA-näytteistä määritettyjen totaali-DNA-määrien sekä STR-DNA-tunnisteiden avulla pystyttiin vertailemaan eri taltiointivälineiden soveltuvuutta DNA-laboratoriossa käytetyille menetelmille. Teippitestauksessa näytemateriaalina oli käytettyjä t-paitoja ja taltiointipuikkojen testauksessa käytettiin kosketusnäytteitä eri tyyppisiltä näytemateriaaleilta. Näytemateriaaleihin pyrittiin saamaan toistettava määrä DNA:ta, jotta taltiointivälineitä pystyttiin vertailemaan keskenään. Kosketusnäytteet osoittautuivat erityisen haasteelliseksi toteuttaa toistettavasti, koska henkilöistä tapahtuvaan DNA:n irtoamiseen ei voida juuri vaikuttaa. Taltiointipuikkoja testattiin myös suun epiteelisoluista valmistetun epiteelisuspension saantokokeilla. Saantokokeiden avulla saatiin vertailukelpoisia tuloksia eri taltiointipuikoille.</p> <p>Teippitestauksessa verrattavien teippien q-PCR-menetelmällä määritetyt DNA-määrät eivät eronneet merkittävästi käytössä olevalla pumpulipuikolla saaduista tuloksista. Teippien käytettävyydessä sen sijaan havaittiin joitakin eroja verrattuna pumpulipuikkoon ja STR-DNA-tunnisteita vertailemalla havaittiin, että toisella teipeistä tunnistetut olivat vahvempia kuin pumpulipuikoilla. Taltiointipuikkojen testauksessa q-PCR-menetelmällä määritettyjen totaali-DNA-määrien avulla havaittiin, että eri välineiden tuloksissa oli eroa, mutta tulokset olivat yhtä hyviä kuin nykyisellä pumpulipuikolla saadut tulokset. Epiteelilaimennossarjan tulosten perusteella ei pystytty osoittamaan eroja taltiointipuikkojen tulosten välillä. Käytömukavuuden ja DNA-tunnisteiden vertailussa kuitenkin havaittiin, että yksi vertailuun valituista taltiointipuikoista soveltuisi näytetaltiointiin jopa paremmin kuin tällä hetkellä käytössä oleva pumpulipuikko.</p>	
Avainsanat	DNA-taltiointi, taltiointivälineet

Author Title	Heidi Toivonen Comparison of DNA Sample Collection Devices
Number of Pages Date	44 pages 1 April 2020
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Minna Eriksson, Project Manager Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>The Bachelor's thesis work was conducted in the National Bureau of Investigation in Vantaa, Jokiniemi. The aim of this thesis work was to test new DNA sampling devices (DSV), comparing them to the DNA-rayon swabs that are in use nowadays. The goal was to find a new DSV that is simple and easy to use in DNA sampling.</p> <p>Two DNA tapes and different swab models were chosen for comparison. The suitability of different DSVs for the methods used in DNA laboratory was compared by analyzing STR-profiles and measuring total-DNA amounts. Tests were conducted with two DNA tapes using tape-lifting method from worn t-shirts. Swab test was conducted using different materials for touch DNA sample recovery. Touch DNA samples proved to be the most challenging to accomplish repeatedly because the amount of DNA that people shed cannot be controlled. Swabs were also tested with yield experiment of epithelial cell suspension made from mouth epithelial cells. Yield experiment was made in order to get comparable results for the swabs.</p> <p>The total DNA amounts of tapes were compared to now used swab and they were analyzed with qPCR method. Analysis showed that there was no significant difference between the results of tapes and used swab. Instead, there was some difference in the usability of the tapes compared to the used swab. Also, the STR-DNA profile comparison showed some differences in profiles of tapes and the used swab, and the DNA profiles of one of the tapes were slightly better than the profile of the used swab. The total DNA amounts of different swabs were analyzed with qPCR method. Comparison of the results showed that there were differences between swab results, but the results were as good as the results of used swab. The series of epithelial cell suspension dilutions showed that there was no significant difference between the swab results. However, the comparison of usability and the analysis of STR-DNA profiles showed that one of the tested swabs was even better than the one that is in use at the moment.</p>	
Keywords	DNA sampling, DNA sampling device

## Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	DNA-tutkimus	2
2.2	DNA-siirtymät	4
2.3	DNA-taltiointimenetelmiä	6
2.4	DNA-taltiointivälineitä	8
2.4.1	Nykyisin käytettävä DNA-näytetaltioinnin pumpulipuikko	8
2.4.2	Teipit	9
2.4.3	Taltiointipuikot	10
2.5	STR-DNA-analyysi	12
2.5.1	Tutkimusnäytteiden esikäsittely ja DNA-eristys	12
2.5.2	Q-PCR-kvantitointi	13
2.5.3	STR-PCR	14
2.5.4	Kapillaarielektroforeesi	14
3	Työn suoritus	15
3.1	Alustavat testit	16
3.2	Näytemateriaalien valmistelu	17
3.2.1	Tekstiilit teipeille	17
3.2.2	Kosketusnäytemateriaalit taltiointipuikoille	17
3.2.3	Epiteelisuspensio taltiointipuikkojen saantokokeisiin	17
3.3	Teippien testaus	18
3.4	Taltiointipuikkojen testaus	19
3.4.1	Kosketusnäytteet	19
3.4.2	Epiteelilaimennossarja	20
4	Tulokset	21
4.1	Alustavat testit	21
4.1.1	Teippien taltiointimenetelmien testaus	22
4.1.2	Taltiointipuikkojen verilaimennossarja	24
4.2	Teippivertailu	26
4.3	Taltiointipuikkojen vertailu	29
4.3.1	Taltiointipuikkojen vertailu kosketusnäytteiden avulla	29
4.3.2	Saantokokeet	37
5	Yhteenveto ja johtopäätökset	38



5.1	Teippien soveltuvuus taltiointiin	38
5.2	Taltiointipuikot	41
	Lähteet	43

## Lyhenteet

CCD	<i>Charged coupled device</i> . Kameroissa käytetty tekniikka, jossa valoherkkien fotodiodien avulla valosta tai infrapunasta muodostetaan digitaalinen signaali.
DNA	Deoksiribonukleiinihappo.
EZ-1	Eristysmenetelmä EZ1 Advanced XL-eristyslaitteelle, jossa käytetään EZ1 DNA Investigator -eristyskittiä.
KRP	Keskusrikospoliisi.
LIMS	<i>Laboratory Information Management System</i> . Laboratorion tiedonhallintajärjestelmä.
MWE	Medical Wire & Equipment -pumpulipuikko.
NFC	<i>National Forensic Centre</i> . Ruotsin rikostekninen laboratorio.
QIASymphony	Eristysmenetelmä QIASymphony SP-DNA -eristyslaitteelle, jossa käytetään QIASymphony DNA Investigator -eristyskittiä.
RNA	Ribonukleiinihappo.
RTL	Rikostekninen laboratorio.
STR	<i>Short tandem repeat</i> . Lyhyt toistojakso.

## 1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Keskusrikospoliisin (KRP) Rikosteknisessä laboratoriossa (RTL) DNA-tutkimusosastolla. RTL:ssa DNA-taltioinnissa eniten käytetty menetelmä on tällä hetkellä pumpulipuikolla penslaus. Menetelmien kehittymisen myötä DNA-tunniste pystytään nykyisin määrittämään yhä pienemmistä määristä näytettä. Tämä on luonut tarpeen entistä tehokkaammille taltiointivälineille, joilla vieläkin pienemmät ja heikommat näytteet saataisiin taltioitua. Kehittyneiden menetelmien lisäksi markkinoille on tullut saataville taltiointipuikkoja useisiin eri käyttötarkoituksiin, monista eri materiaaleista valmistettuina. Tiettyyn käyttötarkoitukseen suunnitellulla taltiointivälineellä saa todennäköisesti taltioitua näytteitä tehokkaasti, jolloin hyvin taltioidusta näytteestä on mahdollista saada analysoitua suurempia määriä tutkittavaa DNA:ta, vaikka itse näyte on heikompi.

Nykyisin käytettävät pumpulipuikot soveltuvat monenlaisen näytteen ottamiseen eikä niitä ole tarkoitettu vain heikoille DNA-näytteille. Pumpulipuikkojen etuna onkin niiden soveltuvuus laajalle kirjolle erilaisia näyttemateriaaleja sekä niiden helppokäyttöisyys, hinta ja saatavuus. Pumpulipuikkojen huonona puolena on, että niihin jää eristyksen jälkeen DNA:ta ja eristys joudutaan tekemään uudelleen, jotta puikkoon jäljelle jäänyt DNA saadaan analysoitua. Pumpulipuikkojen eristystä ei kuitenkaan yleensä pystytä tekemään uudelleen, koska ne on hävitetty ensimmäisen eristyksen yhteydessä. Nykyisten pumpulipuikkojen toinen huono puoli on, että niiden taltioinnissa joudutaan käyttämään saksia, koska pumpulipuikot eivät ole katkaistavia. Lisäksi pumpulipuikot rispaantuvat helposti, esimerkiksi vaatteita penslatessa. Uusi taltiointiväline voisi tehdä taltioinnista tehokkaampaa ja nopeampaa, jos se olisi taltioitavissa helposti esimerkiksi ilman saksia tai uudella välineellä DNA-saanto kasvaisi. [1.]

Työn tavoitteena oli testata ja vertailla DNA-taltiointiin sopivia potentiaalisia taltiointivälineitä, joilla voitaisiin yksinkertaistaa ja nopeuttaa kosketusnäytteiden sekä tekstiileiden DNA-näytetaltiointia.

## 2 Teoria

### 2.1 DNA-tutkimus

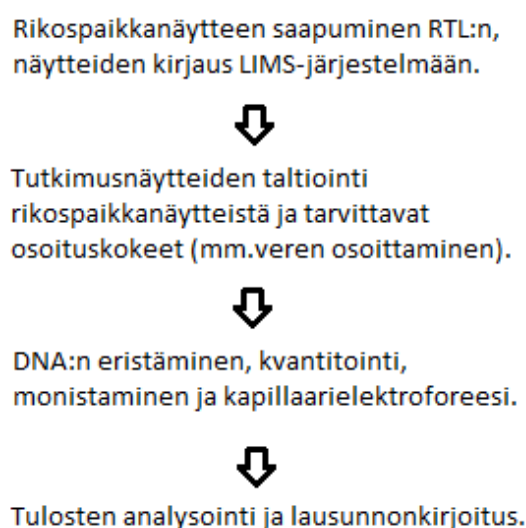
Rikospaikkatutkiminnan asiantuntijapalvelut, kuten DNA-tutkimus, tuotetaan RTL:ssa. RTL palvelee poliisin yksiköitä ja eräitä muita viranomaisia ja tuottaa pääosin esitutkintaa tukevia tutkimuksia. DNA:ta eli deoksiribonukleiinihappoa esiintyy kaikissa tumallisissa soluissa, ja sen takia DNA:ta voidaan tutkia rikospaikoilta löydetystä kaikista biologisista näytteistä. DNA-tutkimukset perustuvat DNA:n STR-alueiden eli lokusten määrittämiseen. Kaikkien ihmisten genomin arvioidaan olevan yli 99,7 % samanlainen, ja yksilöiden väliset erot määräytyvät jäljelle jäävän 0,3 prosentin perusteella. STR eli short tandem repeat -lokukset ovat kahdesta kuuteen emäsparin pituisia toistojaksoja, joita on kaikkialla genomissa, ja yleisimmin ne sijaitsevat geenien välissä. STR-alueiden toistomäärät vaihtelevat eri yksilöiden välillä, ja sen takia STR-analyysi sopii hyvin henkilön tunnistukseen.

RTL:ssa käytössä olevalla kaupallisella menetelmällä tutkittavasta näytteestä saadaan selville henkilön ominaisuuksista ainoastaan sukupuoli, mutta STR-analyysin avulla tietyillä menetelmillä on myös mahdollista tutkia henkilön sairauksia ja muita ominaisuuksia. DNA-tutkimus on vertailututkimusta, jossa näytteistä saatuja DNA-tunnisteita verrataan rikokseen mahdollisesti liittyvien henkilöiden DNA-tunnisteisiin tai DNA-rekisteriin. Esimerkiksi rikospaikalta löytyneestä veripisarasta voidaan määrittää DNA-tunniste ja sitä voidaan verrata epäillyn henkilön DNA-tunnisteeseen ja arvioida, millä todennäköisyydellä kyseinen veripisara on peräisin epäillystä henkilöstä. Usean toistojakson STR-analyysillä tuotetun kahden samanlaisen DNA-tunnisteen esiintymistodennäköisyys on erittäin pieni, koska tutkittavat toistojaksot ovat sellaisia, joissa tiedetään olevan paljon variaatiota ihmisten välillä. Käytännössä jokaisella henkilöllä on erilainen tunniste, jolla henkilö voidaan yksilöidä. Poikkeuksena ovat identtiset kaksoset, jotka voidaan erottaa ainoastaan sormenjälkien perusteella. DNA-tutkimus on monivaiheinen prosessi, jonka jokainen vaihe, eli tutkimus tai käsittely joka näytteelle tehdään, kirjataan laboratorion tiedonhallintajärjestelmään eli LIMS-järjestelmään (Laboratory Information Management System). LIMS-merkinnöillä taataan tutkimuksen luotettavuus ja läpinäkyvyys. [2, s.99-139.]

DNA-taltioinnissa rikospaikkänäytteestä otetaan DNA-tutkimusnäyte laboratoriotutkimuksia varten. Suurin osa RTL:n lähetetyistä rikospaikkänäytteistä on

pumpulipuikkoja, mutta tutkimuksiin lähetetään myös esineitä ja vaatteita. Taltioinnissa pumpulipuikoista leikataan saksilla puikon pää eristysputkeen. Esineistä ja vaatteista otetaan eristysputkeen sopiva tutkimusnäyte siihen sopivalla taltiointivälineellä ja -menetelmällä. Taltiointimenetelmiä ja -välineitä on useita erilaisia, eri käyttötarkoituksiin.

Taltioinnin jälkeen tutkimusnäytteet kulkevat läpi DNA-tutkimusprosessin, jossa näytteen sisältämästä DNA:sta muodostetaan yksilöivä DNA-tunniste, jota pystytään vertaamaan henkilöistä saatuihin DNA-tunnisteisiin. Rikospaikkannäytteiden tutkimusprosessi on esitetty tiivistettynä kuvassa 1.

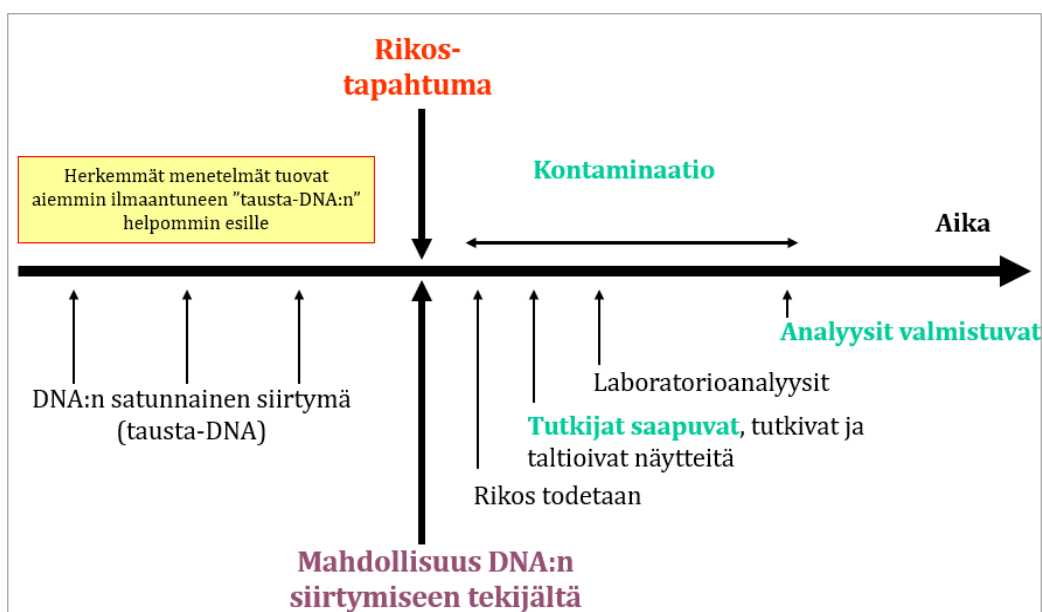


Kuva 1. Rikospaikkannäytteen tutkimusprosessin vaiheet. Taltioidusta biologisesta tutkimusnäytteestä eristetään siinä oleva DNA. Kvantitoinnilla määritetään eristeessä olevan totaali-DNA:n määrä, jonka avulla monistettavan DNA:n määrä optimoidaan. DNA-näytteestä monistetaan valittuja toistojaksoja PCR- eli polymeraasiketjureaktiossa. Monistetut toistojaksot erotellaan kapillaarielektroforeesin avulla, josta saatava data analysoidaan tietokoneohjelmaa apuna käyttäen. Lausunto on raportti, jossa on kuvattu mitä tutkimuksia näytteille on tehty sekä vertailututkimuksen tulokset perustuen näytteistä määritettyihin DNA-tunnisteisiin.

DNA:n analysoinnissa käytettävät menetelmät ovat erittäin herkkiä, ja DNA voidaan saada jo muutaman solun sisältävästä näytteestä [1]. Herkkyyden takia myös kontaminaation riski on suurempi. Näytteiden kontaminoitumista ehkäistään muun muassa sillä, että DNA-tutkimukset tehdään erillisissä puhdastilatyöskentelyyn sopivissa laboratorioissa, joihin pääsy ulkopuolisilta on evätty. Puhdastilatyöskentelyssä suojavarustus on korkeinta tasoa ja tilojen sekä taltioinnissa käytettävien välineiden puhtautta seurataan viikoittain.

## 2.2 DNA-siirtymät

DNA-tutkimuksissa siirtymäksi kuvataan tapahtumaa, jossa DNA siirtyy henkilöstä johonkin esineeseen, pintaan tai toiseen henkilöön. Kontaminaation ja siirtymän erona on niiden tapahtuma-aika. Kyseessä on kontaminaatio, jos näytteeseen siirtyy vierasta DNA:ta toisesta henkilöstä tai esineestä siinä vaiheessa, kun näyte on jo poliisin tutkittavana. Siirtymä on tapahtunut ennen rikosta tai sen aikana ja kontaminaatio vasta rikoksen jälkeen sen tutkimuksen aikana. Kuvassa 2 on esitetty DNA-siirtymän aikajana.



Kuva 2. DNA-siirtymän aikajana [3]. Rikostapahtumaa edeltävänä aikana siirtyy tausta-DNA:ta, rikostapahtumassa rikoksen tekijän DNA:ta ja rikostapahtuman jälkeen siirtynyt DNA on kontaminaatio.

Kontaminaatio voi tapahtua rikospaikalla, näytteen kuljetuksen aikana tai myöhemmissä tutkimusprosessin vaiheissa. DNA-siirtymät voivat olla joko suoria tai epäsuoria. Epäsuorassa siirtymässä DNA siirtyy toisen henkilön tai esineen kautta. Siirtymänä on tavallisimmin kosketus, mutta DNA:ta voi kulkeutua henkilöstä myös muilla tavoin esimerkiksi ilman kautta aivastuksen mukana. Kosketusnäytteiden tutkimuksessa siirtymän arvioinnilla on suuri merkitys.

Siirtymään vaikuttavia muuttujia on useita ja ne voidaan luokitella neljään erilaiseen muuttujaan:

- eri henkilöihin liittyvät muuttujat
- eri kohteisiin liittyvät muuttujat
- siirtymätapahtuman muuttujat
- DNA:n säilymiseen ja taltiointiin liittyvät muuttujat.

Eri henkilöihin liittyviä muuttujia ovat henkilön ikä ja sukupuoli sekä ns. shedder-status. Shedder-termi kuvaa sitä, kuinka paljon henkilöstä irtoaa ihon epiteelisoluja. Shedder-statusen avulla kuvataan sitä, kuinka vahvoja henkilön DNA-siirtymät ovat yleisesti, ja status voi olla joko hyvä tai huono. Hyvän shedder-statusen omaavan henkilön DNA-siirtymät ovat yleisesti hieman keskivertoa vahvempia eli henkilöstä irtoaa keskivertoa enemmän ihosoluja. Shedder-statuksesta on tehty useita tutkimuksia, joissa kosketuksessa siirtyneen DNA:n määrää on seurattu eri henkilöiden välillä. Tutkimuksien perusteella on pystytty havaitsemaan trendejä, joiden mukaan eri henkilöillä DNA:ta siirtyy eri määrä, vaikka tutkimusasetelma on sama. Shedder-statusta on tutkittu kontrolloiduissa tutkimusasetelmissa, joissa henkilöt koskevat tutkittavaan esineeseen tietyn ajan, ja saatuja tuloksia on verrattu keskenään. Tutkimuksissa on huomattu, että vaihtelevissa tilanteissa osalla henkilöistä DNA:ta siirtyy lähes aina suurempia määriä. Näitä henkilöitä kutsutaan hyviksi shedderiksi ja vastaavasti henkilöitä, joilla siirtyvän DNA:n määrä on yleisesti vähäisempää, kutsutaan huonoiksi sheddereiksi. Shedder-status ei ole kuitenkaan täysin yksiselitteinen, sillä myös saman henkilön DNA-siirtymissä on vaihtelua eri ajanhetkinä. Siirtymiin liittyviä muita muuttujia ovat kehon osa, josta siirtyvä DNA on peräisin, sekä solun kudostyyppi. Myös mahdolliset ihosairaudet sekä siirtymää edeltänyt toiminta, kuten peseytyminen, ja ympäristön DNA eli tausta-DNA:n määrä vaikuttavat henkilön DNA-siirtymiin. [4; 5.]

Kohteisiin liittyviä muuttujia ovat siirtymäkohteen pintamateriaali ja siinä oleva tausta-DNA. Pintamateriaalin karheus tai sileys voi kosketuksen aikana vaikuttaa iholta irtoavan DNA:n määrään. Yleisesti karheisiin ja huokosiin materiaaleihin tapahtuneissa siirtymissä DNA-määrät ovat suurempia kuin sileiden ja koven materiaalien siirtymissä. Tausta-DNA on materiaalin pinnalla olevaa DNA:ta, jonka määrä voidaan minimoida puhdistamalla pinta pesuaineella. Henkilön siirtymässä on yleensä aina mukana henkilön omaa DNA:ta sekä tausta-DNA:ta. Hyvä shedder-statusen omaavan henkilön siirtymässä on henkilön omaa DNA:ta suhteessa enemmän kuin tausta-DNA:ta. [4; 5.]

Henkilöihin ja kohteisiin liittyvien muuttujien lisäksi on itse siirtymätapahtumaan liittyviä muuttujia, kuten siirtymän alue eli esimerkiksi alueen koko, mihin henkilö on koskenut tapahtuman aikana. Pääsääntöisesti isommalta alueelta saadaan enemmän DNA:ta kuin pienemmältä alueelta. Suurempi merkitys on kuitenkin siirtymätapahtuman luonteella eli sillä, minkälainen tapahtuma on ollut. Hento kosketus ja voimakas esineen puristaminen ovat eriluonteisia tapahtumia, ja voimakas kosketus vaikuttaa yleensä DNA:n määrää lisäävästi. Myös tapahtuman kestolla ja olosuhteilla, kuten kosteudella ja lämpötilalla, on vaikutusta siirtymään. [4; 5.]

DNA:n säilymiseen, taltiointiin ja analytiikkaan liittyviin muuttujiin kuuluu myös olosuhteet ja aika. Mikäli siirtymä on tapahtunut ulkona esimerkiksi sateessa, ei siirtyneestä DNA:sta ole välttämättä paljon jäljellä kahden viikon kuluttua. Sen sijaan sisätiloissa tyhjässä asunnossa DNA voi säilyä pitkiäkin aikoja. Säilymiseen vaikuttaa myös mahdollinen lisäkontakti ja siitä aiheutuva tausta-DNA tai kontaminoituminen. Tämän takia taltioinnilla on merkittävä osa tutkimuksissa. Taltioinnin onnistumiseen vaikuttaa erityisesti valittu taltiointialue, taltiointiväline ja -tekniikka, mutta myös taltioijalla ja kokemuksella on vaikutusta. Muita muuttujia, jotka vaikuttavat siirtymien tutkimiseen, ovat analytiikkaan liittyvät muuttujat kuten käytetyt menetelmät sekä analyysiparametrit ja -säännöt, joissa on vaihtelua eri laboratorioiden välillä. [4.]

### 2.3 DNA-taltiointimenetelmiä

Näytteen taltiointimenetelmällä, kuljetuksella sekä näytteen säilytyksellä on merkittävä vaikutus siitä saataviin tuloksiin. Ennen taltiointia on yleensä tarpeellista esihakea tahrat, jotta tiedetään mistä kohti DNA-näytettä kannattaa yrittää taltioda. Tietyillä rikosanalytiikkaan tarkoitetuilla valaisimilla voidaan esimerkiksi vaatteista havaita sellaisia tahroja, joita ei paljain silmin pystytä havaitsemaan. Jos esille haussa ei havaita näkyviä tahroja, taltiointikohdan valinta perustuu oletuksiin, joita tehdään rikostutkinnassa selvinneen muun tiedon pohjalta. [5.]

Tavallisin DNA-taltiointimenetelmä on pumpulipuikolla penslaaminen, jossa kostutetulla pumpulipuikolla hangataan tutkittavasta alueesta näyte. Toinen yleinen penslaustekniikka on ”double-swabbing” -tekniikka, jossa näyte penslataan kahdella puikolla, joista ensimmäinen puikko on kostea ja toinen on kuiva. Tämä tekniikka sopii hyvin silloin kun taltiodaan näytettä ihmisen iholta. Penslaaminen sopii useimpien



näytteiden taltiointiin, mutta se ei välttämättä ole aina tehokkain taltiointimenetelmä. Pumpulipuikon tehokkuuteen vaikuttaa sen materiaali ja tiheys sekä näytteenottopään koko, muoto ja paksuus. Myös puikon pakkauksella tai suojaputkella on vaikutus, erityisesti sen kuljetuksen ja säilytyksen kannalta. Monet puikot tai niiden suojaputki on käsitelty kemikaaleilla, jotka parantavat DNA:n säilyvyyttä ja joidenkin vanupuikkojen suojaputket on kehitetty hengittävistä materiaalista, joka estää kosteita näytteitä pilaantumasta ja homehtumasta. Taltioinnissa on yleisimmin käytössä tavallinen, pitkistä kuidusta valmistettu pumpulipuikko. Muita yleisesti käytettyjä taltiointipuikkomalleja ovat *flocked swab* eli lyhyellä nukalla/kuiduilla päällystetty puikko sekä *pad swab* eli vaahtomuovista tai muusta huokoisesta materiaalista valmistettu puikko. Erilaisesta materiaalista valmistetut taltiointipuikot on suunniteltu erityyppisille materiaaleille ja oikeanlaisen taltiointipuikon valinta voi parantaa tuloksia merkittävästi. [1; 5; 6.]

*Tape-lifting* eli teippaaminen miniteipeillä on toinen yleinen taltiointimenetelmä penslaamisen lisäksi. Teipin avulla solut ja DNA saadaan kerättyä tehokkaasti esimerkiksi vaatteista ja iholta. Teippejä käytetään paljon myös erilaisten kuitujen, karvojen ja hiusten taltioinnissa. On pystytty osoittamaan, että teipeillä DNA-saannot huokoisista materiaaleista voivat olla jopa suurempia verrattuna perinteiseen pumpulipuikolla penslaukseen. Teipillä taltioiminen tapahtuu painamalla teippiä kerran tai muutamia kertoja tutkittavalla alueella, jolloin solut tarttuvat materiaalin pinnalta kiinni teipin liimapintaan. Ruotsin rikosteknisessä laboratoriossa NFC:ssä (National Forensic Centre) teippausmenetelmää käytetään vaatteille ja muille kankaille, joista etsitään rikoksesta epäillyn kosketus-DNA:ta. Ruotsin NFC:ssä käsitellään tällä hetkellä vuosittain noin 6 000 teippiä ja teippien käyttö on kasvussa niiden helppokäyttöisyyden ja laajan soveltuvuuden vuoksi. [7; 8.]

Muita käytettyjä DNA-taltiointimenetelmiä ovat esimerkiksi näytteen leikkaaminen, raaputtaminen skalpellilla tai lillutustekniikka. Leikkaustekniikassa näytteestä leikataan pieni pala, missä DNA:n epäillään sijaitsevan. Tätä tekniikkaa käytetään usein pehmeille helposti leikattaville materiaaleille kuten vaatteille tai papereille. Raaputtaminen sopii kuiville näkyville tahroille tai materiaaleille, joita ei pystytä leikkaamaan saksilla. Lillutus sopii esimerkiksi paperinpaloille, joissa ei ole näkyviä tahroja. Kun paperinpala upotetaan veteen, saadaan paperinpalassa olevaa DNA:ta liukenemaan myös veteen. Leikkaaminen ja lillutus ovat tekniikoita, joissa näyttemateriaali ei pysy vahingoittumattomana. Tästä syystä penslaamista ja teippausta suositetaan, koska jäljelle jääneisiin näytteisiin pystytään palaamaan helpommin tarvittaessa. [5; 6.]

## 2.4 DNA-taltiointivälineitä

### 2.4.1 Nykyisin käytettävä DNA-näytetaltioinnin pumpulipuikko

DNA-rikospaikkanaäytetaltioinnissa on nykyisin käytössä Medical Wire and Equipment (MWE) -pumpulipuikot (Kuva 3). MWE-pumpulipuikkojen näytteenottopää on viskoosia, joka on sulfiittiselluloosasta valmistettua pehmeää muuntokuitua [9]. Puikkojen suojakotelo aukeaa molemmista päistä, jolloin puikko voidaan laittaa märkänä suojakoteloon.

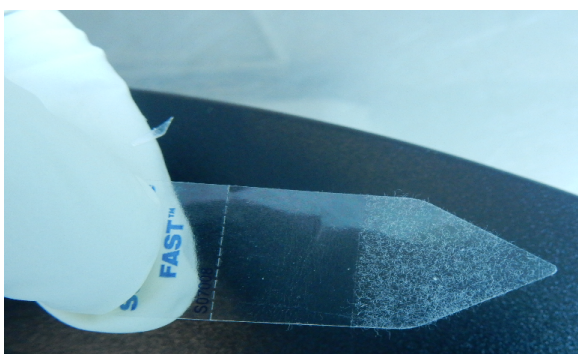


Kuva 3. Medical Wire & Equipment- pumpulipuikko [10].

Penslauksen jälkeen suojakotelon musta pää voidaan irrottaa, jolloin hometta tai muita mikro-organismeja ei pääse kasvamaan, kun puikko pääsee kuivumaan avonaisen suojakotelon ansiosta. MWE-pumpulipuikkojen lisäksi RTL:ssa on myös toisen valmistajan (Sarstedt) pumpulipuikkoja. Sarstedt-puikot ovat samanlaisia kuin MWE-puikot ja niitä käytetään RTL:n DNA-osaston laboratoriossa tapahtuvassa taltioinnissa. MWE-pumpulipuikot ovat yleisesti poliisien käytössä kenttätöyssä, ja ne ovat osa poliisin näytteenottopakkausta. Näytteenottopakkauksessa on MWE-pumpulipuikon lisäksi mukana steriiliä vettä näytteen penslausta varten sekä sinettipussi näytteen säilytystä varten. [10.]

## 2.4.2 Teipit

SceneSafe Fast™ -miniteipit ovat DNA-vapaita, läpinäkyviä, yksittäisiä teippejä. Teippi koostuu liimapintaisesta teippiosasta, ja lisäksi siinä on erillinen läppä, josta näytteenottaja voi pitää kiinni (Kuva 4). Teipit on pakattu rullalle pieneen pahvirasiaan, josta teippejä suojapapereineen voi repäistä yksittäin. [11.]



Kuva 4. SceneSafe Fast™ -miniteippi, jossa näkyvissä teipin liimapinnan kattava alue. Kuva otettu alustavien testien yhteydessä.

DNA-Stub on suojapussiin yksittäispakattu korkillinen DNA:n teippaamiseen sopiva apuväline, jossa on pieni musta teippi liimattuna stubin muovisen osan päähän (Kuva 5).



Kuva 5. Vasemmalla Loci Forensics DNA-Stub ja oikealla QIAassembly Lyse&Spin-eristysputki. Kuvassa DNA-Stubin harmaa osa on alue, josta näytteenottaja voi pitää kiinni taltioinnin aikana. Harmaan osan päällä läpinäkyvän suojakorkin sisällä on musta pehmuste, jonka yläpinnassa on liimapintainen teippi. Kuva on otettu alustavien testien yhteydessä

Ohuen teipin alla on musta pehmuste, jonka avulla teippi muotoutuu hyvin myös epätasaiselle alueelle. Stub on DNA-vapaa, ja se on suunniteltu DNA:n keräämiseen kaikenlaisilta kuivilta pinnoilta, myös huokoisilta materiaaleilta kuten tekstiilit ja iho. DNA:n lisäksi stubilla voi taltioida kuituja ja jauheita. Stubin läpinäkyvä suojakotelo sisältää kosteutta kerääviä rakeita, jotka parantavat näytteen säilyvyyttä. [12.]

### 2.4.3 Taltiointipuikot

Tavallisten pumpulipuikkojen lisäksi, nykyään on olemassa taltiointipuikkoja, joissa on katkaistava pää, tai niille on jokin muu taltiointitapa, johon ei tarvita saksia. Suurin osa markkinoilla olevista taltiointipuikoista, joissa on katkaisukohta, on tarkoitettu koeputkeen tai muuhun isompaan putkeen taltioitavaksi. Katkaistava taltiointipuikko pitäisi mahtua QIASymphony-menetelmässä käytettävään Lyse&Spin-eristysputkeen (Kuva 5.). Eristysputki on tilavuudeltaan 2 ml ja sen yläosassa on korimainen rakenne, joka mahdollistaa näytteen kiintomateriaalin erottelun sentrifugoimalla. Korimainen Lyse&Spin-basket on kooltaan noin puolet eristysputken korkeudesta ja sen maksimi nestetilavuus on 500 µl. Katkaistavia taltiointipuikkoja ovat esimerkiksi Copan 4N6FLOQ -puikko, IsoHelix SK-2S -puikko ja IsoHelix MS-01 -puikko.

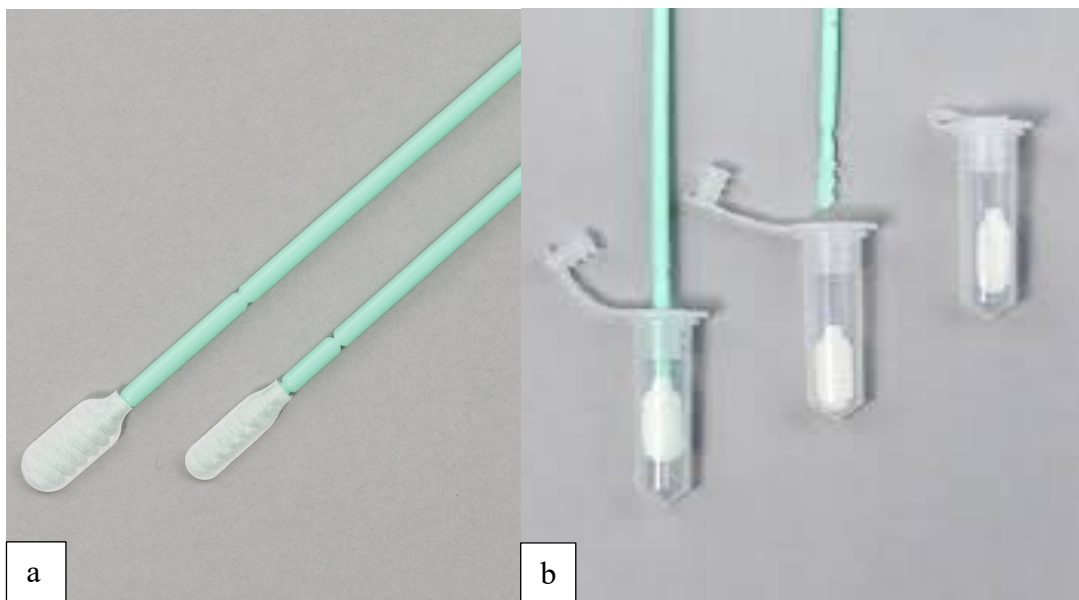
Copan 4N6FLOQ -puikko on lyhyillä nylonkuiduilla päällystetty muovista valmistettu puikko (Kuva 6). Puikossa on katkaisukohta 20 millimetrin kohdalla, jonka ansiosta puikon taltioinnissa ei tarvita saksia. Puikot on suunniteltu erityisesti heikkojen biologisten DNA-näytteiden taltiointiin. Puikon pään lyhyet nylonkuidut absorboivat ja vapauttavat DNA:n nopeammin ja tehokkaammin kuin tavallisen puikon pitkät kuidut. Valmistajan mukaan 4N6FLOQ-puikolla pystytään saada talteen ja vapautettua tutkittavaksi yli 90 % näytteestä.



Kuva 6. Copan 4N6FLOQ- puikko [13].

Copan-puikot ovat ja DNA- ja RNA-vapaita eikä niissä ole PCR-inhibiittoreita. Ne eivät sovi elävästä ihmisestä tapahtuvaan DNA-näytteen taltiointiin, sillä ne on käsitelty mikrobeja tuhoavalla kemikaalilla näytteen säilyvyyden parantamiseksi. Käsittelyn ansiosta näytteen kuivumista edistäviä kosteutta kerääviä yhdisteitä ei tarvita. [13.]

IsoHelixin molemmat puikot (Kuva 7) on suunniteltu ihmisten ja eläinten DNA-näytteiden ottoon, eikä varsinaisesti rikospaikkannäytteiden taltiointiin. IsoHelix SK-2S -puikon näytteenottopää on viskoosista valmistettu ja litteän suorakaiteen muotoinen.



Kuva 7. IsoHelix puikot. Kuvassa (a) vasemmalla puolella isompi puikko SK-2S ja oikealla pienempi MS-01. Kuvassa (b) esitettynä SK-2S-puikon pää irrotus korkin avulla. [14.]

Niiden pinta on muotoiltu sellaiseksi, että ne soveltuvat erityisen hyvin suusta tapahtuvaan näytteenottoon. Puikoissa on katkaisukohta, mutta se on liian suuri

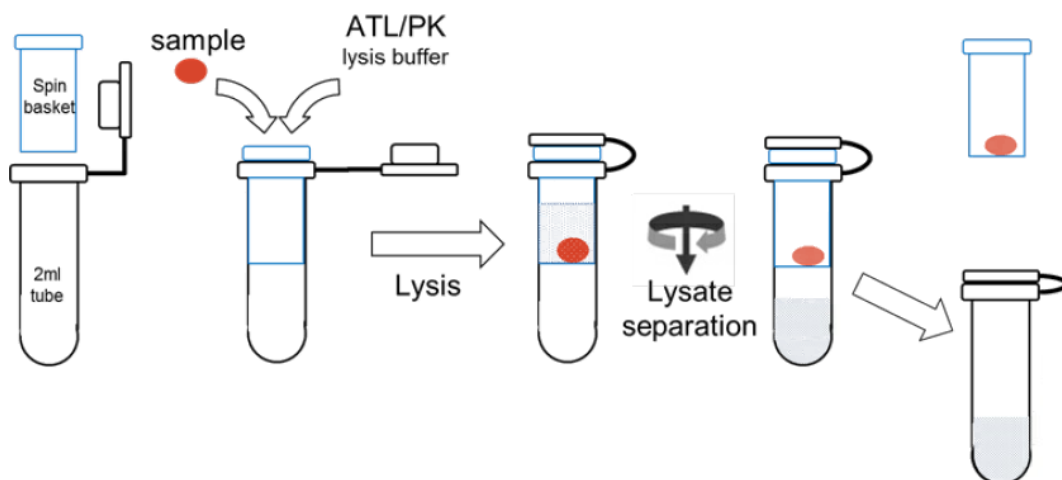
mahtuakseen QIAsymphony-menetelmässä käytettävään eristysputkeen. IsoHelix SK-2S -puikon pakkauksen mukana tulee 1,5 ml:n eristysputki ja erityinen korkki, jonka avulla puikon näytteenottopään saa vedettyä irti puikosta (Kuva 7 b). Tällöin taltiointiin ei tarvita saksia tai muita apuvälineitä. IsoHelix MS-01 -puikko on samaa materiaalia kuin SK-2S, mutta se on kooltaan pienempi, ja siinä on katkaisukohta lähempänä puikon päätä. [14.]

## 2.5 STR-DNA-analyysi

### 2.5.1 Tutkimusnäytteiden esikäsittely ja DNA-eristys

RTL:ssa DNA eristetään käyttämällä EZ1 DNA Investigator -eristyskittiä ja Qiagenin EZ1 Advanced XL -eristyslaitetta (EZ1-menetelmä). Toinen vaihtoehto on QIAsymphony DNA Investigator -eristyskitti ja Qiagenin QIAsymphony SP-DNA -eristyslaite (QIAsymphony-menetelmä).

Molemmilla eristysmenetelmillä voidaan eristää DNA:ta monenlaisista näytematriiseista. EZ1-eristyslaitteella pystytään eristämään korkeintaan 14 näytettä kerrallaan ja menetelmässä lyaatin kiintomateriaali poistetaan manuaalisesti. QIAsymphony-eristyslaitteelle sopivien Lyse&Spin-eristysputkien avulla kiintomateriaali voidaan helposti poistaa lyaatista (Kuva 8) ja sillä voidaan eristää suurempia näytesarjoja kuin EZ1-eristyslaitteella. QIAsymphony-eristyslaitteella pystytään eristämään 24 näytettä kerrallaan ja sillä voidaan tehdä neljä peräkkäistä eristystä eli yhteensä 96 näytettä. [15; 16; 17; 18; 19.]



Kuva 8. Lyse&Spin-basketin toimintaperiaate [19]. Näyte taltioidaan spin-baskettiin ja lyysis-vaiheessa spin-baskettiin lisätään puskuri. Kun näytemateriaalin solut ovat hajonneet, kiintomateriaali erotellaan lysaatista sentrifugoimalla neste spin-basketin läpi eristysputken pohjalle. Tämän jälkeen spin-baskettiin jäänyt kiintomateriaali voidaan poistaa helposti.

EZ1 DNA Investigator -kitin sekä QIA Symphony DNA Investigator -kitin toiminta perustuu silikapäälysteisten magneettipartikkelien käyttöön. Näytemateriaalin solut hajotetaan proteinaasi K -käsittelyllä lämpöhauteella, minkä jälkeen kiintomateriaali poistetaan näytteistä. Näytteistä vapautunut DNA sitoutuu magneettipartikkeleiden pinnalla olevaan silikaan kaatrooppisten suolojen avulla. Magneettipartikkelit irrotetaan saadusta lysaatista ja ne pestään useaan kertaan. Lopuksi magneettipartikkeleihin sitoutunut DNA irrotetaan eluutiopuskuriin. [15; 16; 17; 18; 19.]

## 2.5.2 Q-PCR-kvantitointi

Q-PCR-kvantitoinnissa tutkimusnäytteistä määritetään niiden kokonais-DNA-pitoisuus reaaliaikaisella kvantitatiivisella PCR:llä kuten Qiagenin Rotor-Gene Q-PCR -laitteella. Näytteet voidaan pipetoida käyttäen Qiagenin QIAgility-pipetointirobottia. Kvantitoinnissa käytetään kaupallista Qiagenin Investigator™ Quantiplex Pro RGQ -kittiä, jolla pystytään kvantitoimaan näytteitä, joiden DNA-pitoisuus on 200 ng/μl - 0,5 pg/μl. Quantiplex Pro -kitin avulla saadaan määritettyä näytteen totaali-DNA:n määrä sekä samalla myös miesperäisen DNA:n määrä. Quantiplex Pro -kitin toiminta perustuu TaqMan©-”probeihin” eli koettimiin. TaqMan©-koettimet ovat ”dual labeled” eli kaksoisleimattuja koettimia, jotka sisältävät 5’-päässä fluoresoivan reportterin (reporter),

ja 3'-päässä sammuttajan (quencher). PCR-reaktion ekstensiovaiheessa kitin DNA-polymeraasi leikkaa sammuttajasta fluoroforin, jonka seurauksena laite havaitsee syntyvän fluoresenssin. Fluoresenssi lisääntyy sitä aiemmin mitä enemmän kohdesekvenssiä reaktiossa on. Kohdesekvenssinä toimii 4NS1C, joka on ihmisgenomin useissa autosomeissa esiintyvä 91 emäsparin mittainen alue. Syntyvän fluoresenssin määrä reaktiossa on siis riippuvainen reaktiossa olevasta kohdesekvenssistä eli alkuperäisen näytteen määrästä. Määritetyn DNA-pitoisuuden perusteella pystytään optimoimaan varsinaiseen DNA-STR-analyysiin laitettavan DNA:n määrä. [20.]

### 2.5.3 STR-PCR

DNA-STR-analyysi perustuu DNA:ssa olevien STR-alueiden eli lokusten monistamiseen polymeraasiketjureaktiossa eli PCR-reaktiossa. Tutkittavien lokusten toistomäärissä on tutkitusti havaittu paljon variaatiota eri yksilöiden välillä, jolloin tietyn henkilön usean eri lokuksen toistomäärät määrittämällä saadaan DNA-tunniste, jota voidaan pitää yksilöivänä.

Promega PowerPlex® ESX 17 Fast System -kitti on kaupallinen DNA:n monistamiseen sopiva kitti. Kitin alukkeilla PCR-reaktiossa monistuu samanaikaisesti 16 erilaista mikrosatelliittilokusta eli STR-lokusta sekä X- ja Y-kromosomien Amelogeniini-lokus, joka kertoo sukupuolesta. Monistettavat lokukset ovat D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, FGA, TH01, vWA, D2S441, D10S1248, D22S1045, D1S1656, D12S391, D2S1338, D16S539, D19S433, SE33 sekä Amelogeniini. PCR-laitteena voidaan käyttää esimerkiksi ProFlex® PCR System -laitetta (Applied Biosystems, Life Technologies). [21.]

### 2.5.4 Kapillaarielektroforeesi

PCR-monistuksessa saadut PCR-tuotteet erotellaan kapillaarielektroforeesijon avulla. Ajo voidaan suorittaa esimerkiksi ABI3500xL-laitteella (Applied Biosystems) ja näytteiden pipetoinnissa voidaan käyttää esimerkiksi Tecanin Freedom EVO -pipetointirobottia. Kapillaarielektroforeesilaitteistossa monistetut PCR-tuotteet eli DNA-fragmentit erottuvat toisistaan. Ajon aikana negatiivisesti varautuneet DNA-fragmentit kulkeutuvat polymeeriliuoksella täytetyssä silikakapillaarissa sähkökentän mukana kohti positiivisesti varautunutta elektrodia eli anodia. DNA-fragmenttien erottuminen kapillaarissa perustuu niiden kokoon. Suuremmat fragmentit kulkeutuvat hitaammin



polymeeriliuoksen läpi kuin pienemmät fragmentit. DNA-fragmenteissa on fluoresoiva leima, joiden fluoresenssisignaali eli emissio detektoidaan CCD-kameralla digitaalisesti signaaliksi. Analysaattorin avulla DNA-fragmenttien liikkeestä kapillaarissa muodostetaan kromatogrammeja. Kromatogrammien piikkien sijainnin ja intensiteettien perusteella voidaan tunnistaa tutkittavan DNA:n alleelit. Kapillaarielektroforeesista saadut tulokset voidaan analysoida esimerkiksi Genemapper™ ID-X -ohjelmalla, jossa muodostetaan henkilön DNA-tunniste. [21; 22; 23; 24; 25.]

### 3 Työn suoritus

Opinnäytetyön näytteiden taltiointiin käytetyt taltiointimenetelmät olivat penslaus ja teippaus eli tape-lifting. Vertailtavat taltiointivälineet on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Opinnäytetyössä vertailuun käytetyt taltiointivälineet ja niiden valmistajat. Medical Wire & Equipment-pumpulipuikot ja Sarstedt-pumpulipuikot toimivat vertailukohteina uusille välineille.

Taltiointiväline	Valmistaja	LOT
Pumpulipuikko	Medical Wire & Equipment	62944
Pumpulipuikko	Sarstedt	8051611
4N6FLOQ-puikko	Copan	1913478
SK-2S-puikko	IsoHelix	3692
MS-01-puikko	IsoHelix	3257
Fast-minuteippi	SceneSafe	60325
DNA-Stub	Loci Forensics	2022

DNA:n eristykseen käytettiin kahta erilaista eristysmenetelmää rinnakkain, siten että osa alustavista testeistä tehtiin käyttäen Qiagenin EZ1 DNA Investigator (48) -eristyskittiä, ja Qiagenin EZ1 Advanced XL -eristyslaitetta. Kaikki varsinaiset tutkimusnäytteet eristettiin käyttäen Qiagenin QIAsymphony DNA Investigator (192) -eristyskittiä ja Qiagenin QIAsymphony SP-DNA -eristyslaitetta. DNA-näytteiden taltioinnissa sekä analysoinnissa käytetyt menetelmät suoritettiin käytettyjen menetelmien työohjeiden mukaisesti. Työohjeet perustuvat laitevalmistajien ja kaupallisten reagenssikittien valmistajien ohjeisiin, sekä RTL:n laatukäsikirjaan, joka ei ole julkisesti saatavilla. Vertailutestien kaikista näytteistä määritettiin DNA-tutkimusprosessin menetelmien mukaisesti totaali-DNA:n määrät Q-PCR-kvantitoinnilla käyttäen Qiagenin Rotor-Gene Q-PCR -laitetta ja Qiagenin Investigator™ Quantiplex Pro RGQ (200) -kittiä. STR-PCR tehtiin käyttäen ProFlex® PCR System -laitetta (Applied Biosystems, Life Technologies)

ja Promegan PowerPlex® ESX 17 Fast System -kittiä (DC1710). Kapillaarielektroforeesiajo tehtiin ABI3500xL-laitteella (Applied Biosystems) ja näytteiden pipetointi käyttäen Tecanin Freedom EVO -pipetointirobottia. Kapillaarielektroforeesista saadut tulokset analysoitiin Genemapper™ ID-X -ohjelmalla. Eri välineillä otettujen näytteiden totaali-DNA-määriä sekä DNA-tunnisteita vertailtiin toisiinsa ja lisäksi arvioitiin eri välineiden käyttömukavuutta, ja soveltuvuutta taltiointiin. Eri välineillä saatuja tuloksia tarkasteltiin tilastollisen tarkastelun menetelmiä käyttäen.

### 3.1 Alustavat testit

Vertailumateriaalin tekemiseen valittiin henkilöt shedder-statusta vertailevan alustavan testin perusteella 10 henkilön joukosta. Kolme henkilöä, joiden DNA-kvantitointitulokset tässä testissä olivat kaikkein suurimmat eli joiden shedder-status oli hyvä, valittiin varsinaisten vertailumateriaalien tekemiseen.

Shedder-status-testin alussa henkilöt pesivät kätensä saippualla ja kuivasivat ne käsipyyhepaperiin. Tämän jälkeen he pitivät nitrilihanskoja tunnin ajan käsissään. Tunnin kuluttua testihenkilöt ottivat molempiin käsiin Falcon-putket, joita he pitivät käsissään 1 minuutin ajan. Falcon-putket oli puhdistettu etukäteen DNA-Away-puhdistusaineella ja säilytetty Minigrip-pusseissa. Myöhemmin Falcon-putkista penslattiin Sarstedt-pumpulipuikoilla tutkimusnäytteet. Tutkimusnäytteet eristettiin EZ1-eristysmenetelmää käyttäen ja niistä määritettiin totaalikvantit Quantiplex Pro -menetelmällä [20.].

Muissa alustavissa testeissä testattiin välineiden käyttömukavuutta, ja mahdollisia taltiointitapoja, ja karsittiin lopullisissa vertailutesteissä käytettävät taltiointivälineet. Teippien alustavissa testeissä näytemateriaalina teipattiin puhdasta laboratoriotakin kangasta, minkä jälkeen teippejä taltioitiin eri tavoilla QIASymphony-eristysputkiin (Qiagen, Investigator Lyse& Spin Basket Kit (50)). Teipeistä ei määritetty totaali-DNA:n määrää vaan testattiin ainoastaan eristysvaihe. Taltiointipuikkojen osalta alustavissa testeissä tutkittiin niiden katkaistavuutta ja muita taltiointiominaisuuksia verrattuna MWE-pumpulipuikkoon, sekä niiden soveltuvuutta QIASymphony-eristysmenetelmälle. Taltiointipuikkojen alustavassa testissä käytettiin näytemateriaalina verta, josta tehtiin laimennokset pitoisuuksilla 1:10 ja 1:100.

## 3.2 Näyttemateriaalien valmistelu

### 3.2.1 Tekstiilit teipeille

Teippitestauksen näyttemateriaaliksi valittiin 100 prosenttista puuvillaa olevat t-paidat. T-paidat pestiin kotioloissa pesukoneessa pienellä määrällä pesuainetta, ja annettiin kuivua. Testihenkilöitä ohjeistettiin peseytymään testipäivää edeltävänä iltana ja pukeutumaan t-paitaan testipäivän aamuna. T-paitaa pidettiin päällä koko testipäivän ajan, vähintään 10 tunnin ajan. Kullekin kolmelle testihenkilölle oli neljä kappaletta t-paitoja.

### 3.2.2 Kosketusnäyttemateriaalit taltiointipuikoille

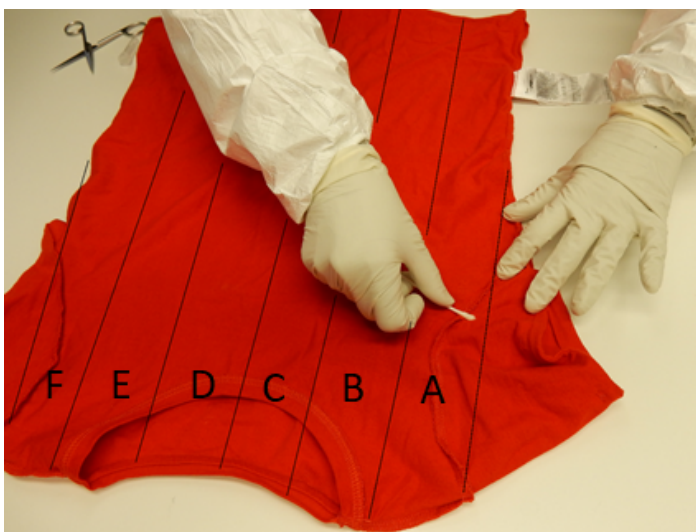
Kosketusnäytteiden materiaaleiksi valittiin lasilevy, peltilevy sekä muovinen kirjoitusala. Kaikki kolme testihenkilöä tekivät kosketusnäytteitä kaikille kolmelle materiaalille. Siirtyvän DNA:n määrää pyrittiin kontrolloimaan ennen näytteen tekemistä tapahtuvilla toistettavilla toimenpiteillä. Tausta-DNA:n määrää pyrittiin vähentämään sillä, että testihenkilöt pesivät kätensä lämpimällä vedellä noin tunti ennen näytteiden tekemistä. Tämän jälkeen testihenkilö teki rutiinitöitään tietokoneella noin tunnin ajan, jonka jälkeen teki yhden levyn tai alustan. Testihenkilöillä oli kaikilla oma henkilökohtainen työpiste, ja käytettävä tietokoneen näppäimistö oli pyydetty puhdistamaan testijaksoa edeltävänä päivänä. Kosketusnäytteet tehtiin hinkkaamalla käsiä yhden minuutin ajan materiaaleihin merkityllä testialueella.

### 3.2.3 Epiteelisuspensio taltiointipuikkojen saantokokeisiin

Epiteelisuspensio valmistettiin suun epiteelisoluista ja syljestä. Näyttemateriaali saatiin keräämällä yhdeltä testihenkilöltä 30 poskitikkunäytettä Sarstedt-puikoille. Kaksi poskitikun pumpulia taltioitiin näytteeksi samaan 5 ml:n eppendorf-putkeen, johon lisättiin 1 ml milliQ-vettä. Näytteitä ravisteltiin 30 minuutin ajan, jonka jälkeen jokaisesta eppendorf-putkesta erotettiin kiintomateriaali. Jäljelle jäänyt neste sentrifugoitiin 3 minuutin ajan 13 000 rpm:n nopeudella. Sentrifugoinnin jälkeen putkista pipetoitiin pois suurin osa supernatantista, ja putkiin jäljelle jääneet sakat eli epiteelisuspensio yhdistettiin samaan eppendorf-putkeen, joka täytettiin milliQ-vedellä niin, että lopputilavuudeksi saatiin 1 ml. Poolattu epiteelisuspensio jaettiin pienempiin 100-200 µl eriin, ja niitä säilytettiin pakkasessa -18 °C:ssa.

### 3.3 Teippien testaus

Teippien testauksessa verrattiin Scenesafe Fast™ -miniteippiä (LOT: 60325) ja Loci Forensics DNA-Stubia (LOT:2022) DNA-taltioinnissa käytössä olevaan Medical Wire & Equipment- pumpulipuikkoon (LOT:62944) taltioimalla DNA-näytteitä t-paidoista. T-paidan koko nurja puoli jaettiin kuuteen suunnilleen yhtä suureen pystysuoraan alueeseen paidan selkäpuoli mukaan lukien (Kuva 9).



Kuva 9. Teippitestauksen näytteiden taltiointi. Kuvassa penslataan MWE-pumpulipuikolla näytettä t-paidasta (mustalla viivalla merkityltä alueelta). Nurinpäin käännetty t-paita jaettiin kuuteen osaan mustien viivojen mukaisesti. Jaetut alueet nimettiin kirjaimin A–F, jotta eri paidoista otetut näytteet eivät olisi samalta alueelta ja samalla välineellä otettuja.

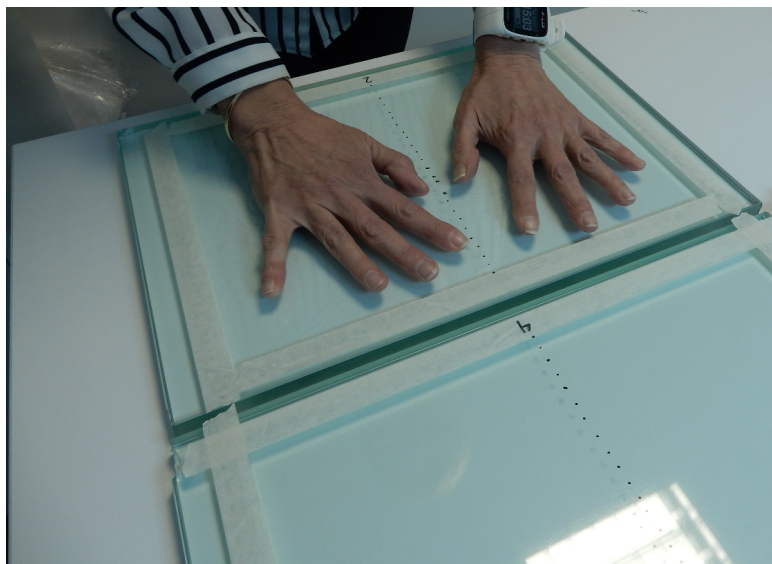
Kaikilla kolmella testivälineellä (MWE-pumpulipuikko, miniteippi ja DNA-stub) otettiin kullakin kaksi näytettä kahdelta vaihtelevalta alueelta A–F (Kuva 6) yhdestä paidasta. Alueiden A–F leveydet olivat noin 5 cm. Pumpulipuikot kostutettiin steriiliin veteen, minkä jälkeen niillä penslattiin valitut kaksi testialuetta (A–F) t-paidasta. Testialueen koko oli leveydeltään noin 5 cm ja pituudeltaan koko paidan pituus etu- ja takapuoli mukaan lukien. T-paidat olivat eri kokoisia (S-kokoisesta L-kokoiseen), joten paidan testialueen leveys ja pituus vaihteli. Pituuksia ei mitattu erikseen, vaan paidat jaettiin silmämääräisesti kuuteen osaan kuvan 9 osoittamalla tavalla. Miniteipillä sekä DNA-stubilla taltioitiin kahdelta testialueelta näytteet, niin että samalta alueelta ei painettu teipillä kuin yhden kerran. Yhteensä neljästä t-paidasta saatiin 24 näytettä/testiväline. Näytteiden

taltiointialueiden paikkaa piti vaihdella, sillä DNA-määrät vaatteissa ovat usein suurempia tietyillä alueilla, kuten kaula-aukon kohdalla. Kaulan aluetta ei suuremmasta DNA-määrästä huolimatta jätetty pois, jotta DNA:ta saatiin riittävästi. Muilla t-paidan alueilla oli oletettavasti heikommin DNA:ta.

### 3.4 Taltiointipuikkojen testaus

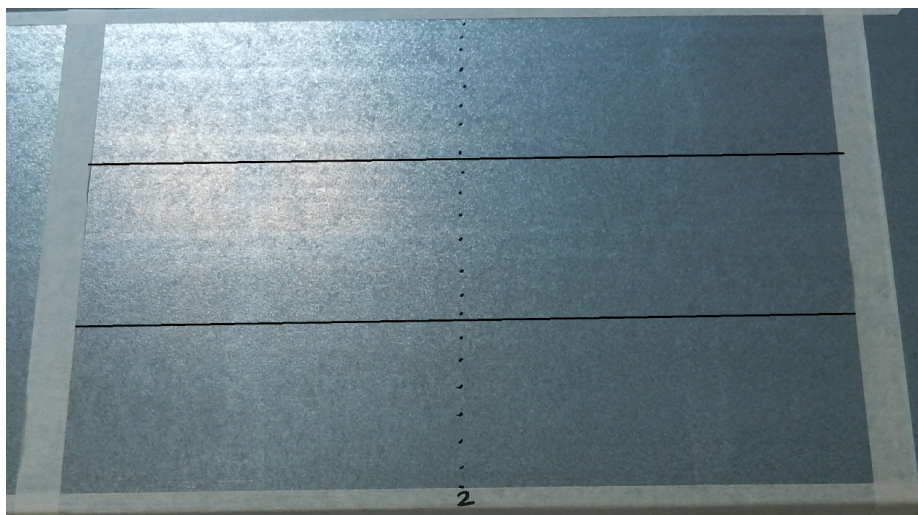
#### 3.4.1 Kosketusnäytteet

Kosketusnäytteiden avulla voitiin verrata taltiointipuikkojen eroja niiden käyttömukavuudessa ja eroja penslattavuudessa. Testattavien puikkojen vertailukohtana oli käytössä oleva Medical Wire & Equipment- pumpulipuikko (LOT:62944). Vertailuun valitut muut taltiointipuikot olivat Copan 4N6FLOQ- puikko (LOT:1913478 ja IsoHelix SK-2S- puikko (LOT:3692). Kosketusnäytteitä varten testihenkilöt olivat valmistaneet näytemateriaaleja hinkkaamalla käsistään DNA:ta lasilevyille, peltilevyille ja muovialustoille. Levyille ja alustoille oli merkitty testialueeksi 25 cm x 35 cm kokoinen alue. Testialue oli lisäksi jaettu oikean ja vasemman käden alueisiin, joihin testihenkilö hankasi käsiään yhden minuutin ajan (Kuva 10).



Kuva 10. Kosketusnäytteiden valmistelu. Lasilevyihin oli merkitty mustalla viivalla alueet molemmille käsille, joihin testihenkilö hankasi käsiään yhden minuutin ajan. Vaalealla teipillä oli merkitty testialueen ulkoreuna.

Kaikkia eri materiaaleja oli neljä kappaletta, eli yhteensä kukin testihenkilö teki kosketusnäyttemateriaaleja 12 kappaletta. Lasilevyjen, peltilevyjen ja muovialustojen testialueet jaettiin kuuteen osaan (kolme näytettä oikean käden alueelta ja kolme näytettä vasemman käden alueelta), jolloin yhdeltä levyltä tai alustalta saatiin otettua kaksi näytettä jokaisella kolmella vertailtavalla taltiointipuikolla (Kuva 11). Näytteenottoalue kaikilta materiaaleilta oli kooltaan sama noin 8,3 cm x 17,5 cm kokoinen alue.



Kuva 11. Peltilevyn testialueen jako. Testialue jaettiin kuuteen yhtä suureen näytteenottoalueeseen (8,3 cm x 17,5 cm), josta eri taltiointivälineillä taltioitiin näytteet vaihdellen näytteenottoaluetta.

Eri taltiointipuikolla penslattavia testialueita vaihdeltiin tasaisesti, jotta mahdollinen DNA:n epätasainen irtoaminen käsistä levyn/alustan pintaan ei vääristäisi vertailun tuloksia.

#### 3.4.2 Epiteelilaimennossarja

Epiteelilaimennossarjan avulla tutkittiin MWE-, Copan- ja IsoHelix -taltiointipuikkojen materiaalin vaikutusta DNA-saantoon tunnetuilla DNA-määrillä. Epiteelisuspension DNA-konsentraation määrittämisen jälkeen puikoille pipetoitiin tunnettu määrä DNA:ta, ja selvitettiin laskennallinen saanto. Kun näytteistä lopuksi analysoitiin DNA, saatiin todellinen saanto, jonka perusteella laskettiin kullekin puikolle saantoprosentti. Saantoprosenttien perusteella vertailtiin eri taltiointipuikkojen DNA-hävikkiä.



Epiteelisuspension DNA-konsentraation selvittämiseksi tehtiin pieni testisarja. Näytteet valmistettiin pipetoimalla 10 µl, 20 µl ja 30 µl poolattua epiteelisuspensiota kolmelle Sarstedin pumpulipuikolle. DNA eristettiin käyttäen EZ-1-menetelmää ja kvantitoitiin qPCR-menetelmän mukaisesti. Kvantitoinnissa jokaiselle näytteelle tehtiin rinnakkaiset näytteet, joiden tulosten keskiarvojen perusteella laskettiin DNA-pitoisuus (ng/µl). Tulosten perusteella poolatun epiteelisuspension DNA-pitoisuudeksi saatiin 4,8475 ng/µl.

Lopulliseen epiteelilaimennossarjaan valittiin laimennokset, jotka olivat 3,2 ng; 1,6 ng; 0,8 ng ja 0,4 ng. Epiteelilaimennossarjan näytteet valmistettiin pipetoimalla 10,6 µl kutakin neljää eri laimennosta kaikille testattaville taltiointipuikoille (MWE, Copan 4N6FLOQ, IsoHelix SK-2S). Jokaisesta laimennoksesta tehtiin kolme rinnakkaista näytettä per taltiointipuikko.

Epiteelilaimennossarjan näytteet analysoitiin QIASymphony-eristysmenetelmällä tehden qPCR-kvantitointi sekä STR-PCR kahdella rinnakkaisella PCR-näytteellä. Eri välineillä saatavat kvantitointituloksista eli totaali-DNA-määrästä analysoitiin niiden saantoprosentit, joita vertailtiin keskenään ANOVAn avulla. Analysoidut DNA-tunnisteet tarkasteltiin RTL:n DNA-lausuntoihin ilmoitettavien tuloksien normaalien hyväksymissäntöjen mukaisesti. DNA-tunnisteiden hyväksytyjen alueiden määriä vertailtiin keskenään ja siten arvioitiin DNA-tunnisteen vahvuutta.

## 4 Tulokset

### 4.1 Alustavat testit

Taltiointivälineiden vertailumateriaalin tekemiseen tarvittiin kolme henkilöä, joiden shedder-status olisi mahdollisimman hyvä, jotta varsinaisiin testeihin tehtävistä kosketusnäytteistä saataisiin riittävän vahvoja. Teippien taltiointia olisi voinut kokeilla käyttämättömillä teipeillä, mutta niillä päätettiin kuitenkin teipata kangasta, koska käytetty teippi vastasi paremmin oikeaa tutkimusnäytettä kuin käyttämätön teippi. Jos taltiointipuikot soveltuisivat QIASymphony-eristykseen, näytteistä määritettäisiin totaali-DNA q-PCR-menetelmällä. Totaali-DNA-tuloksia vertailemalla arviotiin kannattiko kaikkia taltiointipuikkoja ottaa mukaan lopulliseen vertailuun.

#### 4.1.1 Teippien taltiointimenetelmien testaus

##### SceneSafe Fast™ -miniteippi

Teippien ensimmäisessä testissä miniteippi laitettiin eristysputkeen kokonaisena ilman spin-baskettia. Tapaa kokeiltiin, koska teippi oli kaikkein helpoin taltioda kokonaisena, ja kokonaisena se ei mahdu pieneen spin-baskettiin. Ilman spin-baskettia lyysauksen ja eristyksen arvioitiin olevan riskialtista, joten teipille piti kokeilla erilaisia taltiointimenetelmiä, joilla teippi saadaan mahtumaan spin-basketin sisään. Miniteipit ovat läpinäkyviä, minkä takia niiden käsittelyssä täytyy olla erittäin tarkka, ettei teipin liimapinta liimaudu putken reunoihin niitä taltioidessa. Pieneksi silpuksi leikattuna läpinäkyvät miniteipin palat jäivät kiinni saksiin ja teipin käsittely oli sen jälkeen hankalaa. Sen sijaan kahteen osaan leikattuna miniteipin sai hyvin saksien avulla aseteltua spin-basketin reunoille. Tätä spin-basketissa olevaa puoliksi leikattua teippiä, ja kokonaista miniteippiä ilman spin-baskettia testattiin myös QIASymphony-menetelmälle.

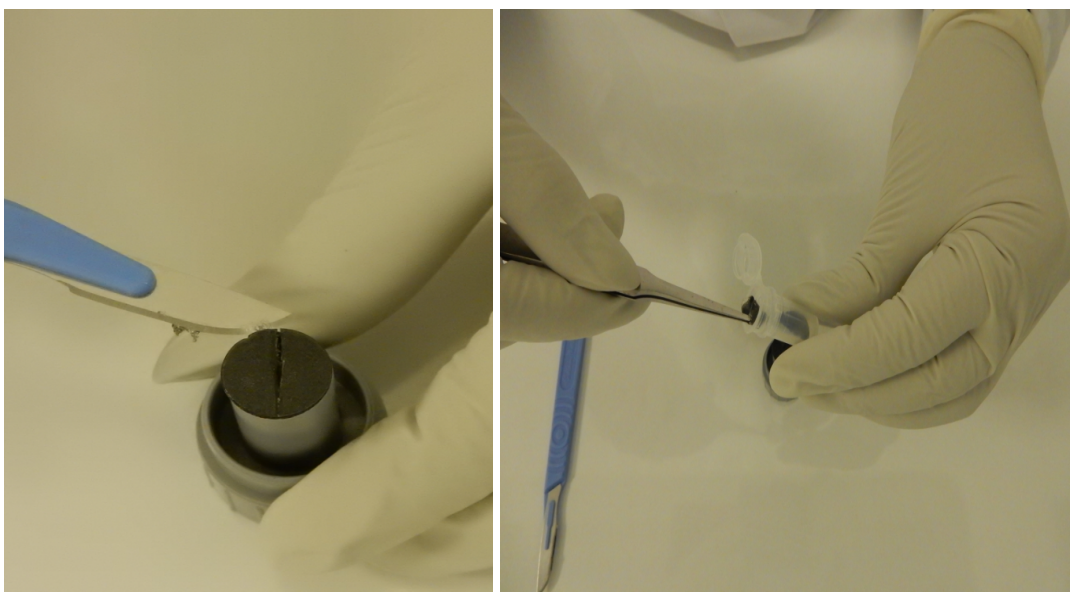
QIASymphony-menetelmän lyysauksessa eristysputkeen lisätään lyysisreagenssiseosta, jonka avulla DNA liukenee nesteeseen, minkä jälkeen neste erotetaan spin-basketillisista putkista sentrifugoimalla, ja tavallisista putkista pipetoimalla. Lyysis-vaiheen aikana havaittiin, että kokonainen miniteippi tarttui helposti kiinni pipettiin, ja koko eristyksen havaittiin olevan niin riskialtista kontaminaatiovaaran ja eristyslaitteen rikkoutumisen takia, ettei teippien analysointia ilman spin-baskettia koettu järkeväksi menetelmäksi. Spin-basketissa olleet puoliksi leikatut miniteipit eivät olleet liimaantuneet liikaa putken reunoihin ja nesteen erottelu sentrifugoimalla onnistui hyvin, eikä eristyslaitteen toiminnan kannalta havaittu muita riskejä, joten se todettiin parhaaksi taltiointitavaksi miniteipeille. Huonona puolena havaittiin, että teippi ei täysin peittynyt nesteellä, joten osa DNA:sta saattoi jäädä teippiin kiinni.

##### Loci Forensics DNA -Stub

DNA-stubin valmistajan, Loci Forensics, mukaan DNA-näyte taltioidaan stubista pumpulipuikkoon imeyttämällä. Tämä menetelmä hylättiin, koska pumpulipuikolla penslaukseen haluttiin vaihtoehtoinen helppo menetelmä ja imeytys ei olisi yksinkertaistanut taltiointia lainkaan. Imeyttämisen sijaan DNA-stubin päässä oleva musta pehmuste, ja sen päällä sijaitseva teippi päätettiin leikata yhdessä suoraan spin-baskettiin. Teippi pehmusteineen kokeiltiin taittaa kaksinkerroin spin-baskettiin ja lisäksi



teippiä kokeiltiin myös leikata puoliksi, ja laittaa puolikkaat spin-baskettiin. Myös pelkkä teippi kokeiltiin erikseen leikata skalpellilla puolikkaina spin-baskettiin (Kuva 12).



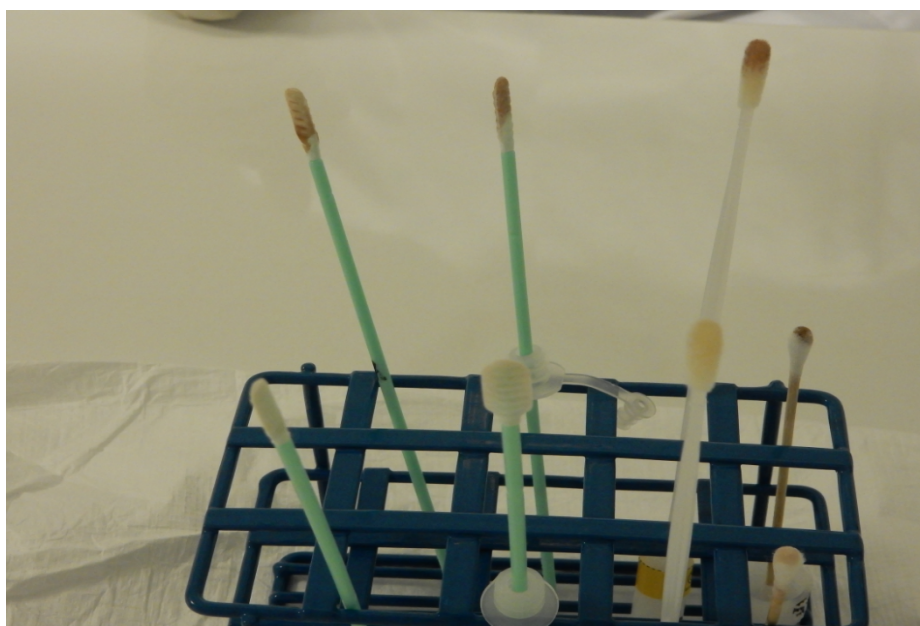
Kuva 12. Alustavissa testeissä DNA-stubia kokeiltiin leikata skalpellilla (vasen kuva), mutta tällöin puolikkaat täytyi laittaa Lyse&Spin-baskettiin pinsettien avulla. Saksilla leikatessa teipin sai aseteltua spin-baskettiin pelkkien saksien avulla.

Taltioinnin osalta helpoin tapa oli taittaa teippi pehmusteiseen puoliksi tai leikata se saksilla kahteen osaan. Skalpellilla leikkaaminen vei näistä testatuista menetelmistä kaikkein eniten aikaa. Kaikki näytteet eristettiin käyttäen QIASymphony-menetelmää.

Lyysis-vaiheessa stubien ongelmana oli se, että ne näyttivät välillä liimaantuvan putken reunoihin. Lisäksi, jos stubin puolikkaat eivät olleet riittävän alhaalla spin-basketissa lyysisreagenssiseos ei riittänyt peittämään koko teippiä, ja osa DNA:sta saattoi jäädä liukenematta. Kokonaisena taitettu stub oli avautunut lyysauksessa tapahtuvan ravistelun aikana, ja näytti liimaantuvan herkästi putken seiniin. Sentrifugoinnin aikana stubit eivät peittäneet spin-basketin aukkoja vaan neste erottui, kuten piti. Parhaaksi taltiointitavaksi valikoitui stubin teipin leikkaaminen saksilla puoliksi ja puolikkaiden asettelu spin-baskettiin mahdollisimman alhaalle ja keskelle. Kaikkiaan stubit vaikuttivat sopivan ihan hyvin QIASymphony-menetelmällä eristettäväksi.

#### 4.1.2 Taltiointipuiikkojen verilaimennossarja

Uudet testattavat taltiointipuiikot olivat kaikki hyvin erityyppisiä keskenään ja erilaisia referenssi-pumpulipuiikkoon verrattuna. Taltiointipuiikoille tehdyissä alustavissa testeissä tutkittiin niiden soveltuvuutta QIASymphony-eristysmenetelmälle, ja käyttömukavuutta taltioinnin osalta. Kosketusnäytteistä saatavia DNA-tuloksia oli vaikea vertailla, koska jokainen kosketusnäyte on erilainen ja tuloksiin vaikuttavia muuttujia on paljon. Kosketusnäytteiden sijaan alustavaksi testiksi valmistettiin pieni verilaimennossarja, joka eristettiin QIASymphony-menetelmällä. Verilaimennossarjan pitoisuudet olivat 1:10 ja 1:100, joiden tiedettiin olevan sopivan vahvuisia laimennoksia kvantitointiin. Molempia verilaimennoksia pipetoitiin 20 µl/taltiointipuiikko. Pipetoidessa tarkasteltiin imeytyykö veri eli nestemäinen näyte eri tavalla taltiointipuiikkoihin. Lisäksi tarkasteltiin puiikkojen katkeavuutta ja ei-katkaistavilla puiikoilla niiden leikkautuvuutta. Verilaimennossarjassa Copan-puiikkoja ja molempia IsoHelix-puiikkoja verrattiin Sarsted-pumpulipuiikkoihin (Kuva 13).



Kuva 13. Verilaimennosta pipetoituna vertailtaville taltiointipuiikoille. Kaikkein vasemmalla IsoHelix MS-01 -puiikko, keskellä vasemmalla IsoHelix SK-2S -puiikko, keskellä oikealla Copan 4N6FLOQ -puiikko ja reunassa oikealla Sarsted-pumpulipuiikko. Kuvassa takarivillä verilaimennos 1:10 ja eturivissä verilaimennos 1:100. Sarsted-puikossa veri jäänyt lähinnä puikon kärkeen verrattuna Copan-puiikkoon, jossa veri selkeästi levinnyt laajemmalle alueelle. IsoHelix-puiikkoihin neste oli levitetty pipetin kärjellä imeytymisen parantamiseksi.

Alustavassa testissä havaittiin, että Sarsted-pumpulipuikko imee verilaimennoksen syvälle pumpuliin, ja pumpulinpää leikkautuu kosteana helposti. Copan-puikon nylonflock-materiaali erosi imeytyvyydeltään huomattavasti Sarsted-pumpulipuikosta. Verilaimennokset imeytyivät Copan-puikon näytteenottopään pintaa pitkin laajemmalle alueelle (imeytyminen muistutti kankaanpalan/paperin imeytymistapaa). Copan-puikon katkaistava pää katkesi helposti spin-baskettiin, vaurioittamatta eristysputken tai spin-basketin reunoja. Copan-puikon katkaisupää on sen verran pitkä, että se mahtui juuri ja juuri spin-baskettiin. Eristysputkessa liian ylös jäävä puikon pää saattaa aiheuttaa sen, että eristysputki vuotaa nesteen kiivetessä puikkoa pitkin ylöspäin. Molempien IsoHelix-puikkojen materiaali on sellaista, ettei neste aluksi imeydy niihin vaan jää ensin pisaroina puikon pinnalle. Pipetinkärjellä sivelemällä nesteen sai kuitenkin imeytymään. IsoHelix SK-2S -puikot oli helppo taltioida putkeen niiden mukana tulevien irrotuskorkkien avulla. Puikon pää irtosi puikon varresta hyvin, vaikka riskinä oli, että irrotuskorkki ja samalla puikon pää lipeäisi otteesta. Irrotuskorkki on suunniteltu eristysputkeen, joka tulee IsoHelix SK-2S -puikon pakkauksen mukana eikä se sovi kunnolla QIASymphony-eristysputkeen siinä olevan spin-basketin takia. Vain irrotuskorkin alareunan sai tuettua spin-baskettiin, joten hyvällä otteella oli iso merkitys IsoHelix-puikkojen taltioinnissa. Silmäämääräisesti näytti, että IsoHelix-puikkojen pää mahtui juuri ja juuri spin-baskettiin niin, ettei se vuotaisi. Pienempi IsoHelix MS-01 -puikko oli imeytyvyyden suhteen samanlainen kuin IsoHelix SK-2S -puikko. MS-01-puikossa puikon pää ei ollut irrotettavissa samalla tavalla korkin avulla, vaan se täytyi leikata saksilla.

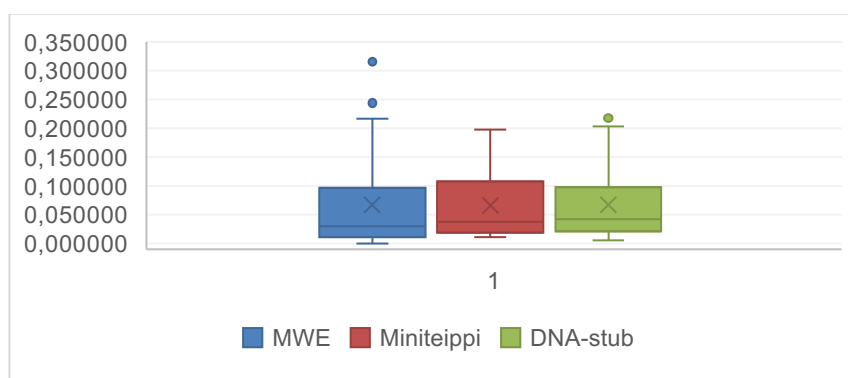
Verilaimennossarjan eristyksessä havaittiin, että Copan-puikkojen päät ovat niin pitkiä, että nesteen noustessa niiden pintaa pitkin neste pisaroitui korkkiin, ja nestettä kovettui eristysputken ja sen korkin väliin aiheuttaen vuotoriskin. Näytteet eivät kuitenkaan vuotaneet. Ratkaisuna ongelmaan konsultoitin Copanin yhteyshenkilöä, joka neuvoi tekemään näytteiden inkuboinnin ilman ravistelua, joten varsinaisille testinäytteille Copan-puikkojen osalta tehtiin modifioitua esikäsittelyä.

Alustavana testinä tehdyn verilaimennossarjan kvantitointitulosten perusteella kaikilla välineillä saatiin suunnilleen yhtä hyviä tuloksia. Testiotos oli hyvin pieni, eikä sen perusteella voinut tehdä suurempia johtopäätöksiä. Tuloksista kuitenkin nähtiin, että kaikkien taltiointipuikkojen DNA-eristys oli onnistunut ja niillä saadut kvantitointitulokset olivat samaa suuruusluokkaa kuin referenssipuikon tulokset. Käyttömukavuuden perusteella vertailusta karsittiin pois IsoHelix MS-01 -puikko. IsoHelix MS-01 -puikko karsittiin, koska vaikka niillä saadut kvantitointitulokset olivat yhtä hyviä kuin muiden

puikkojen tulokset, ei niitä pystytty taltioimaan käyttämättä saksia, joten MS-01-puikot päätettiin jättää pois lopullisista vertailuista.

## 4.2 Teippivertailu

Kaikista 12 t-paidasta taltioitiin yhteensä 24 tutkimusnäytettä miniteipillä, 24 tutkimusnäytettä DNA-stubilla ja vastaavasti 24 tutkimusnäytettä MWE-pumpulipuikolla. Tutkittuja DNA-alueita oli yhteensä 17 ja suurimmasta osasta kaikkien välineiden näytteistä saatiin 16–17 hyväksytyn alueen DNA-tunnisteita. MWE-pumpulipuikoilla otetuista näytteistä yhdeksällä ei saatu täyttä 17 alueen DNA-tunnistetta. Vastaavasti miniteipeillä täyttä 17 alueen DNA-tunnistetta ei saatu kuudesta näytteestä ja stubeilla kolmesta näytteestä. Laatikko-janakuvaajassa (Kuva 14) on esitetty kaikilla eri välineillä saatujen kvantitointitulosten eli totaali-DNA-määrän jakaumat.



Kuva 14. T-paidoista otettujen näytteiden kaikkien henkilöiden teippitestin kvantitointitulokset eri taltiointivälineillä (24 näytettä/väline). Kuvaajassa sinisellä värillä on esitetty MWE-pumpulipuikolla saatujen kvantitointitulosten jakaumaa. Punaisella värillä on esitetty miniteipin kvantitointitulosten jakaumaa ja vihreällä värillä DNA-stubien kvantitointitulosten jakaumaa. Kvantitointitulosten yksikkö on ng/μl.

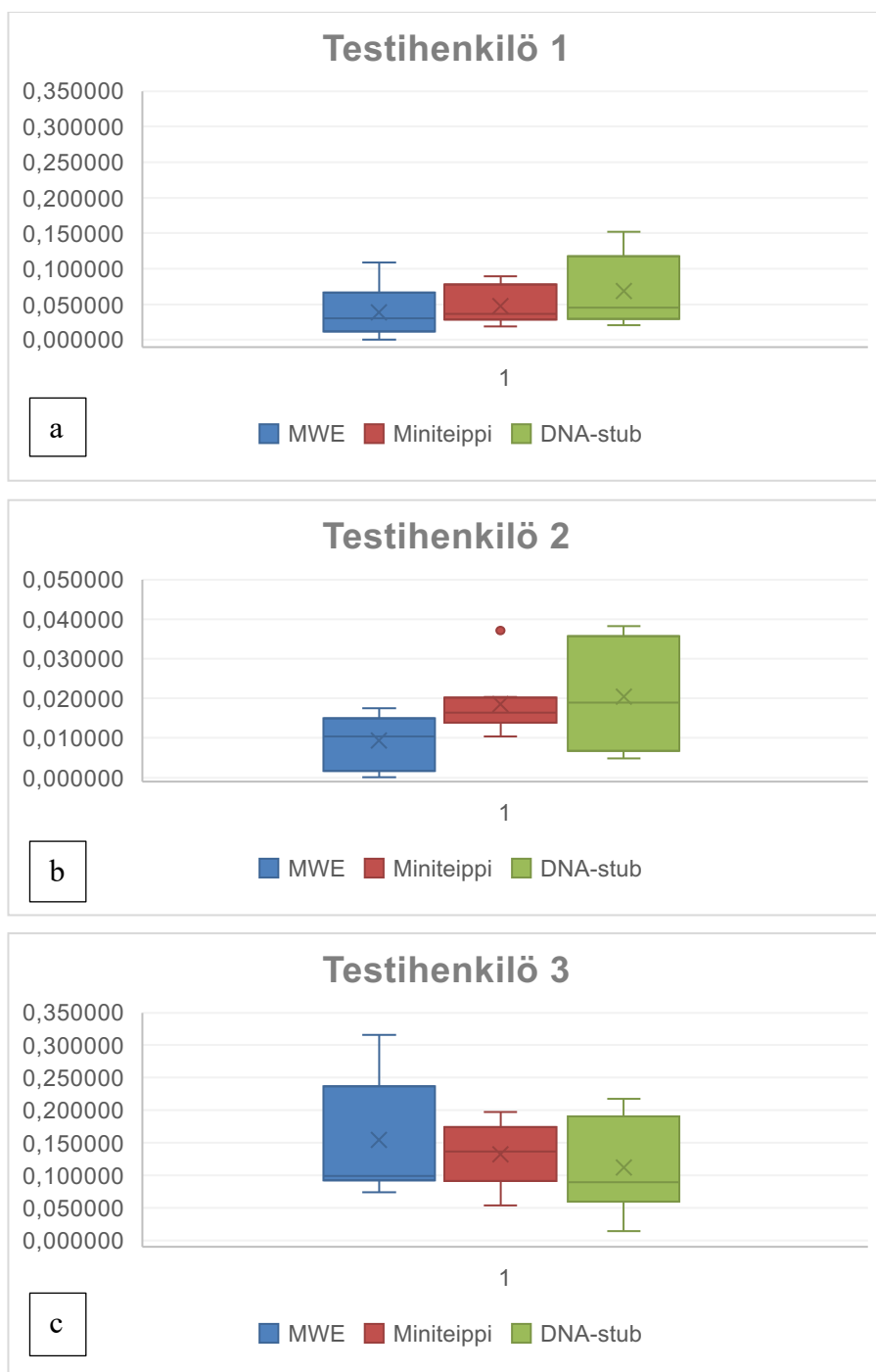
Kuvaajasta (Kuva 14) nähdään, että välineiden kvantitointitulosten jakaumien välillä on vain pientä vaihtelua. Kvantitointitulokset analysoitiin myös käyttäen kaksisuuntaista ANOVAa, jossa toistot olivat sallittuja. Eri välineillä saatujen tulosten keskiarvot on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Taltiointivälineiden kaikkien testihenkilöiden kvantitointitulokset 24 näytteelle. T-paita teippitestauksen tulosten ANOVA-analyysin keskiarvot DNA-määrille (ng/μl).

<i>Väline</i>	<i>Keskiarvo (ng/μl)</i>	<i>Varianssi</i>
Pumpulipuikko	0,06742	0,00702
Miniteippi	0,06604	0,00339
DNA-stub	0,06698	0,00384

ANOVA-analyysin mukaan kaikilla eri välineillä saatu totaali-DNA:n määrä jäi alle 0,07 ng/μl ja eri välineillä otettujen näytteiden kvantitointitulosten välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla. Eri testihenkilöiden tulosten välillä sen sijaan tilastollisesti merkitsevää eroa oli 95 %:n luottamustasolla. Tämän perusteella eri välineiden kvantitointituloksia tarkasteltiin uudelleen vielä henkilöittäin.

Eri testihenkilöiden teippitestien kvantitointituloksia on esitetty kuvan 15 a-c laatikko-janakuvaajissa. Ylin kuvaaja a esittää testihenkilön 1 tuloksia, keskimäinen kuvaaja b testihenkilön 2 tuloksia ja alimmainen kuvaaja c esittää testihenkilön 3 tuloksia.



Kuva 15. Kuvaajissa a-c esitetty teippitestauksen t-paidoista otettujen 24 näytteen kvantitointituloksia eri testihenkilöiden välillä. Kvantitointitulosten yksikkö on ng/μl.

Laatikko-janakuvaaja (Kuva 15 a) esittää testihenkilön 1 kvantitointituloksia. Kuvaajasta nähdään, että eri välineillä saatujen totaali-DNA-määrien keskiarvot ovat lähellä toisiaan, ja kaikkien näytteiden DNA-määrät olivat alle 0,20 ng/μl. Kuvaajan perusteella miniteipeillä saaduissa DNA-määrissä oli vähiten vaihtelua, ja DNA-stubeilla saaduissa DNA-määrissä oli eniten vaihtelua. Testihenkilön 1 DNA-stubien DNA-määrät olivat

hieman suurempia kuin muilla välineillä, mutta kaikkien välineiden tulosten mediaanit olivat kuitenkin lähes samat (noin 0,025-0,050 ng/μl).

Testihenkilön 2 laatikko-janakuvaajassa (Kuva 15 b) havaittiin välineiden välisessä vertailussa enemmän eroja kuin testihenkilön 1 kohdalla. Vastaavasti kuin testihenkilön 1 tuloksissa myös testihenkilön 2 tuloksissa vähiten vaihtelua oli miniteipeillä, ja eniten vaihtelua DNA-stubeilla. Testihenkilön 2 eri välineillä saaduissa DNA-määrissä oli vähemmän vaihtelua kuin testihenkilöllä 1, sillä kaikkien välineiden kvantitointitulokset olivat alle 0,04 ng/μl (testihenkilöllä 1 ne olivat alle 0,16 ng/μl). Suurimmat DNA-määrät saatiin DNA-stubeilla, mutta mediaanien vertailu osoitti eron olevan hyvin pientä (0,01-0,02 ng/μl) eli kaikilla välineillä saatiin suunnilleen samaa suuruusluokkaa olevia tuloksia.

Laatikko-janakuvaajasta (Kuva 15 c) nähdään, että testihenkilön 3 kvantitointitulokset olivat suurempia kuin muiden testihenkilöiden. Mahdollinen syy suurempiin DNA-määriin oli se, että testihenkilön 3 havaittiin olevan parempi shedder kuin testihenkilöiden 1 ja 2. Testihenkilön 3 erona testihenkilöihin 1 ja 2 oli se, että suurimmat DNA-määrät saatiin MWE-pumpulipuikoilla DNA-stubien sijasta. Myös testihenkilön 3 kohdalla miniteippien DNA-määrissä oli vähiten vaihtelua.

Testihenkilöiden näytteet analysoitiin uudestaan yhden testihenkilön näytteet kerrallaan, käyttäen yksisuuntaista ANOVA-analyysiä, jotta testihenkilöstä peräisin oleva vaihtelu voitiin minimoida. ANOVA-analyysi osoitti, että myöskään henkilöittäin verrattuna välineiden väliset erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä 95 %:n luottamustasolla. DNA-tunnisteiden vertailu osoitti, ettei eri välineillä ollut vaikutusta niistä saataviin DNA-tunnisteisiin vaan kaikilla välineillä tunnisteet olivat suurimmalta osin vahvoja yli 16 hyväksytyn alueen tunnisteita.

#### 4.3 Taltiointipuikkojen vertailu

##### 4.3.1 Taltiointipuikkojen vertailu kosketusnäytteiden avulla

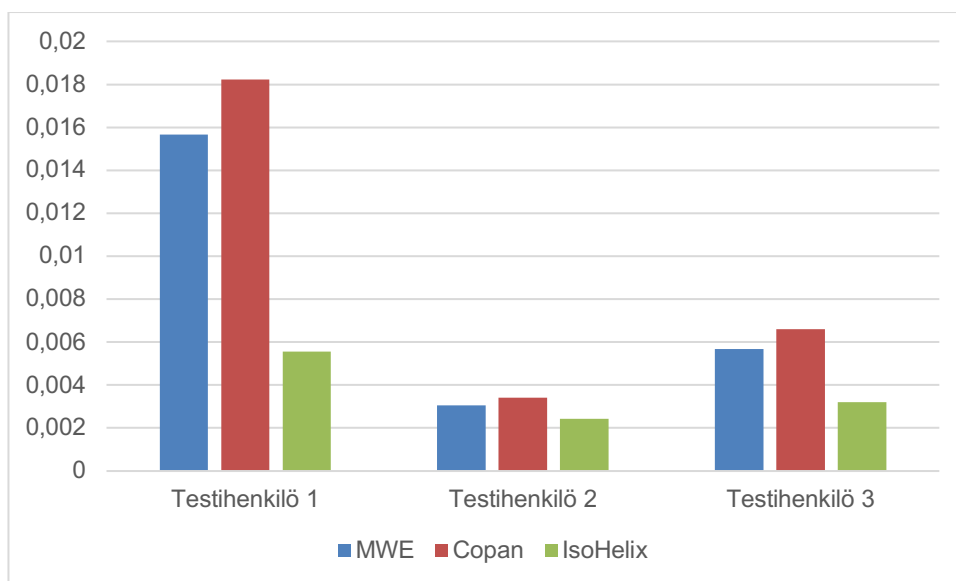
Alustavissa testeissä havaittiin, että IsoHelix MS-01 -puikoissa puikon pää ei ollut irrotettavissa, vaan se täytyi leikata saksilla kuten MWE-pumpulipuikko, minkä perusteella se karsittiin pois lopullisesta taltiointipuikkojen vertailusta. Varsinainen taltiointipuikkojen vertailu tehtiin kosketusnäytteistä sekä epiteelilaimennossarjan näytteistä eri taltiointivälineillä saatujen kvantitointitulosten DNA-määriä vertaamalla.

Kosketusnäytteet tehtiin kolmelle eri materiaalille (lasi, pelti ja muovi). Erilaisilla materiaaleilla pystyttiin vertaamaan, onko taltiointipuikoilla eroja, kun niillä penslataan erityyppisiä pintoja. Lasilevy on pintana kova ja sileä, minkä vuoksi kosketuksessa ei siirry paljoa DNA:ta ja yleisesti saman tyyppisistä pinnoista saa heikkoja tunnisteita. Karheampi peltilevy hankaa kosketuksen aikana ihoa enemmän, ja samalla DNA:ta siirtyy todennäköisesti enemmän, eli saadaan parempia tunnisteita. Muovinen kirjoituslusu valittiin materiaaliksi, koska rikospaikkänäytteitä otetaan usein myös muovisilta pinnoilta, kuten veitsen kahvoista tai auton ohjauspyörästä. [5.] Kosketusnäytteiden tuloksiin mahdollisesti vaikuttavia tekijöitä olivat taltiointivälineiden lisäksi testihenkilö, kosketusnäytemateriaali ja materiaalien näytteenottoalue. Tuloksien vaihteluun vaikuttavia tekijöitä tutkittiin ANOVAn avulla.

Käytettävyys oli kaikkein parasta Copan-puikolla, sillä niissä olevan katkaisukohdan ansiosta puikkojen taltiointi oli todella nopeaa ja yksinkertaista. IsoHelix-puikkojen erillisellä korkilla tehtävä puikon pään irrotus alustavissa testeissä sujui ongelmitta, mutta suurten näytemäärien myötä sen havaittiin olevan hieman epäkäytännöllinen, ja lisäksi puikon mukana tulevasta korkeista ja ylimääräisistä eppendorf-putkista tulee turhaa muovijätettä. MWE-puikkoon verrattuna Copan-puikon taltiointi oli nopeampaa ja helpompaa. Eristysvaiheessa Copan-puikkojen pituuden havaittiin aiheuttavan vuotoriskin, mikä Copanin yhteyshenkilön mukaan oli estettävissä eristysvaiheen esikäsittelyssä tehtävän inkubaation modifioinnilla.

Kaikkien testihenkilöiden eri taltiointivälineillä saatujen kvantitointitulosten keskiarvot kaikkien materiaalien kosketusnäytteistä on esitetty kuvan 16 kuvaajassa.

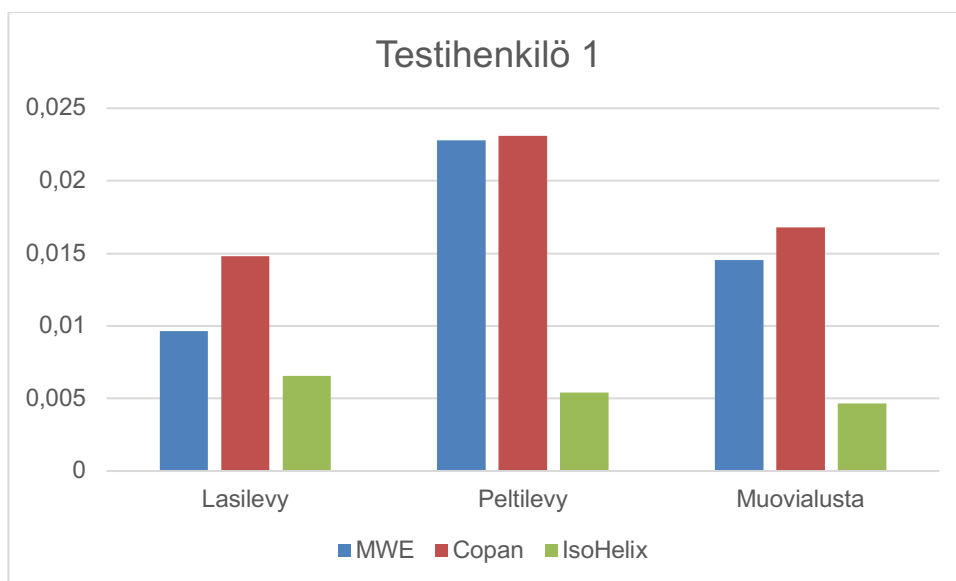




Kuva 16. Kuvaajassa sinisellä värillä on esitetty MWE-puikolla saatujen DNA-määrien keskiarvot eri testihenkilöillä. Punaisella värillä on esitetty Copan-puikolla saatujen DNA-määrien keskiarvot eri testihenkilöillä ja vihreällä värillä IsoHelix-puikkojen DNA-määrien keskiarvot eri testihenkilöillä. Tulokset on ilmoitettu yksikössä ng/μl.

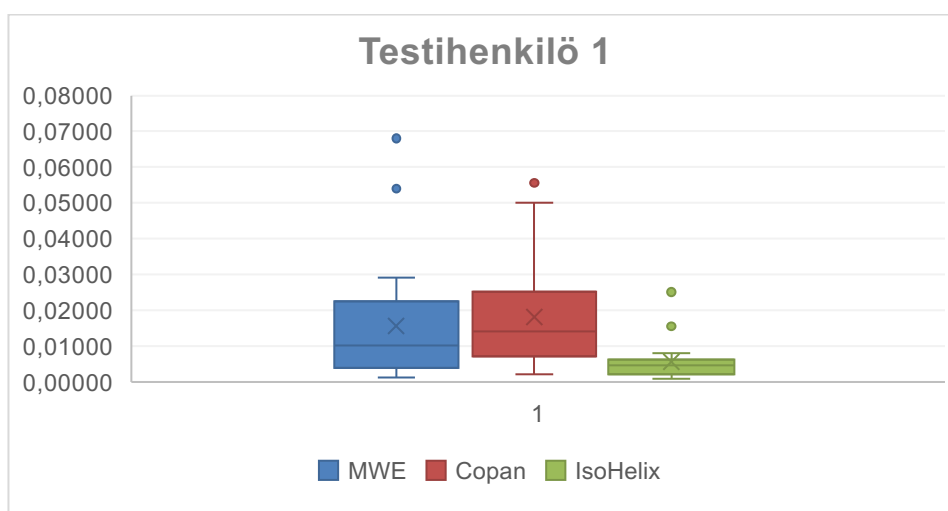
Kuvaajan (Kuva 16) perusteella nähdään, että testihenkilöiden tulosten välinen vaihtelu on huomattavaa. Suuruusluokaltaan huomattavasti vaihtelevat tulokset eivät olleet suoraan vertailukelpoisia, minkä takia tulokset analysoitiin henkilöittäin. ANOVA-analyysien mukaan testihenkilön, taltiointivälineen sekä näytemateriaalin vaikutus tulosten vaihteluun oli tilastollisesti merkitsevää 95 %:n luottamustasolla. Näytteenottoalueen vaikutus tulosten vaihteluun ei ollut tilastollisesti merkitsevää luottamustasolla 95 %.

Testihenkilön 1 kosketusnäytteiden kvantitointitulosten keskiarvot eri taltiointivälineillä ja näytemateriaaleilla on esitetty kuvaajassa 17 ja eri välineillä saatujen kvantitointitulosten jakaumat on esitetty kuvaajassa 18.



Kuva 17. Testihenkilön 1 tulokset (8 näytettä/väline/materiaali). Kuvaajassa sinisellä värillä on esitetty MWE-puikolla saatujen DNA-määrien keskiarvot. Punaisella värillä on esitetty Copan-puikolla saatujen DNA-määrien keskiarvot ja vihreällä värillä IsoHelix-puikkojen DNA-määrien keskiarvot. Tulokset on ilmoitettu yksikössä ng/μl.

Kuvista 17 ja 18 nähdään, että kvantitointitulosten perusteella kaikkein pienimmät DNA-määrät saatiin IsoHelix-puikoilla muovialustalta ja suurimmat saatiin Copan- puikoilla peltilevyiltä.

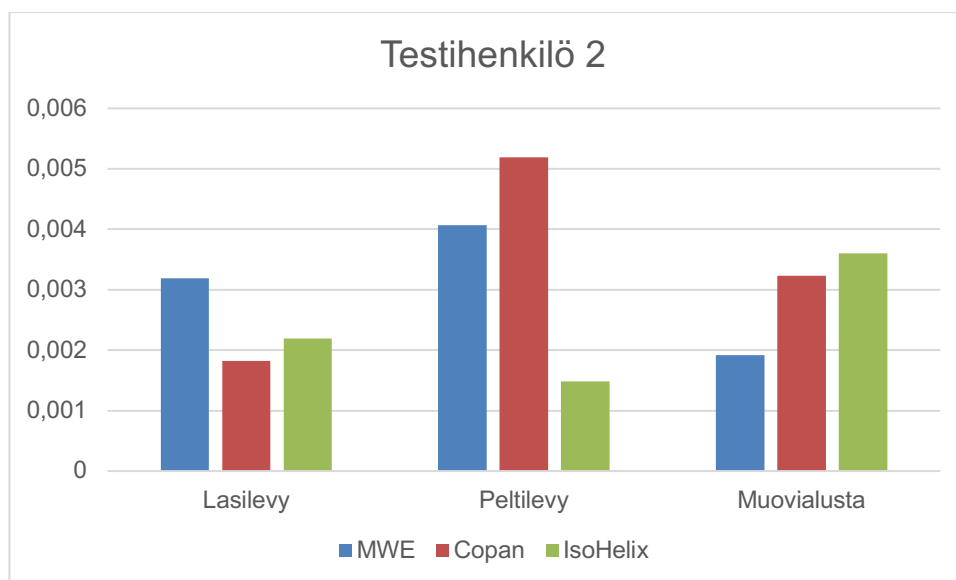


Kuva 18. Testihenkilön 1 tulosten jakauma kaikilla kosketusnäyttemateriaaleilla (24 näytettä/väline). Kuvaajassa sinisellä värillä on esitetty MWE-puikolla saadut kvantitointitulokset. Punaisella värillä on esitetty Copan-puikolla saadut kvantitointitulokset ja vihreällä värillä IsoHelix-puikoilla saadut kvantitointitulokset. Tulokset on ilmoitettu yksikössä ng/μl

Kuvan 18 kuvaajassa on havainnollistettu testihenkilön 1 kvantitointitulosten jakaumia eri välineillä. Tuloksissa oli muutama poikkeava arvo, jotka on esitetty kuvaajassa pisteinä. Poikkeavien arvojen analysoinnissa niiden havaittiin olevan poikkeuksellisen suuria tuloksia, jotka voitiin kuitenkin hyväksyä. Testihenkilön 1 tuloksissa MWE-puikkojen ja Copan-puikkojen tulosten jakaumissa on paljon samankaltaisuutta ja IsoHelix-puikkojen DNA-määrät ovat kaikkein pienimmät.

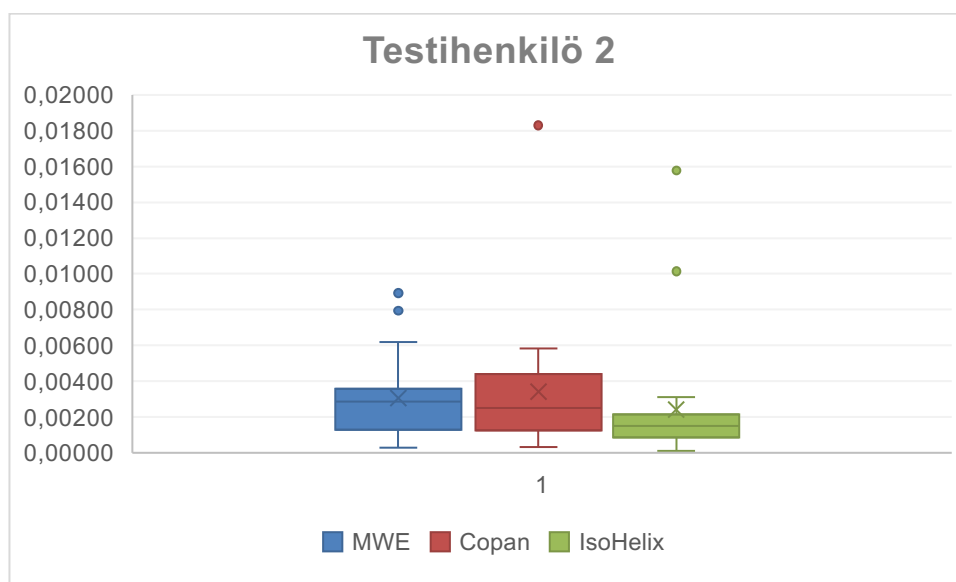
ANOVA-analyysi osoitti, että eri välineillä saatujen kvantitointitulosten väliset erot olivat tilastollisesti merkittäviä luottamustasolla 95 %. IsoHelix-puikkojen kvantitointitulokset olivat pienempiä kuin Copan- ja MWE-puikkojen. T-testin perusteella Copan-puikkojen ja MWE-puikkojen kvantitointituloksissa ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevää eroa luottamustasolla 95 %. Kaikille testihenkilön 1 näytteille analysoitiin myös niiden DNA-tunnisteet. Näytteistä täysiä 17 alueen DNA-tunnisteita saatiin vain kolmesta näytteestä. Tunnisteet olivat suurimmalta osin vajaita alle 13 hyväksytyn alueen DNA-tunnisteita eikä selkeitä taltiointivälineestä johtuvia eroja tai materiaalista johtuvia eroja pystytty DNA-tunnisteiden perusteella havaitsemaan.

Testihenkilön 2 kosketusnäytteiden kvantitointitulosten DNA-määrien keskiarvot eri taltiointivälineillä ja näytemateriaaleilla on esitetty kuvassa 19 ja eri välineillä saatujen kvantitointitulosten jakaumat on esitetty kuvassa 20.



Kuva 19. Testihenkilön 2 tulokset (8 näytettä/väline/materiaali). Kuvaajassa sinisellä värillä on esitetty MWE-puikolla saatujen DNA-määrien keskiarvot. Punaisella värillä on esitetty Copan-puikolla saatujen DNA-määrien keskiarvot ja vihreällä värillä IsoHelix-puikkojen DNA-määrien keskiarvot. Tulokset on ilmoitettu yksikössä ng/μl.

Testihenkilön 2 kvantitointituloksien perusteella (Kuva 19) lasilevyiltä suurimmat DNA-määrät saatiin MWE-puikoilla ja pienimmät määrät Copan-puikoilla. Peltilevyillä suurimmat DNA-määrät saatiin Copan-puikoilla ja pienimmät määrät IsoHelix-puikoilla. Muovialustoilla suurimmat DNA-määrät saatiin IsoHelix-puikoilla ja pienimmät määrät MWE-puikoilla. Kuvasta 19 havaitaan, että näyttemateriaali aiheuttaa paljon vaihtelua kosketusnäytteiden tuloksiin.



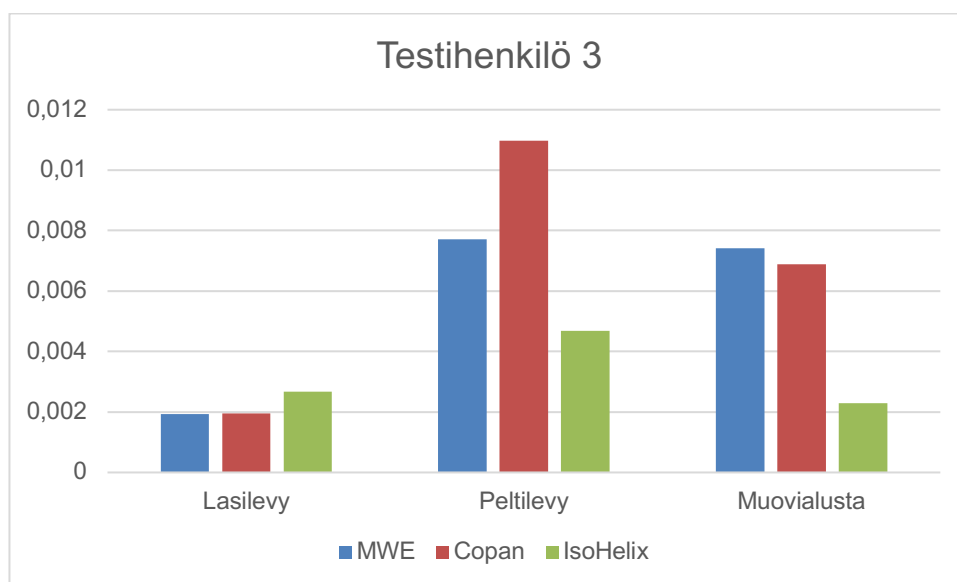
Kuva 20. Testihenkilön 2 tulosten jakauma kaikilla kosketusnäyttemateriaaleilla (24 näytettä/väline). Kuvaajassa sinisellä värillä on esitetty MWE-puikolla saadut kvantitointitulokset. Punaisella värillä on esitetty Copan-puikolla saadut kvantitointitulokset ja vihreällä värillä IsoHelix-puikoilla saadut kvantitointitulokset. Tulokset on ilmoitettu yksikössä ng/μl

Kuvan 20 kuvaajan perusteella havaitaan paremmin IsoHelix-puikkojen muita puikkoja pienemmät DNA-määrät. IsoHelix-puikon tulokset olivat testihenkilön 2 tuloksista myös kaikkein vähiten jakautuneita. Copan-puikkojen tulosten mediaani oli hieman pienempi kuin MWE-puikoilla, mutta muuten MWE- ja Copan-puikkojen kvantitointitulosten jakaumissa ei ole havaittavissa suuria eroja.

Tulosten analysointi ANOValla osoitti, ettei testihenkilön 2 eri taltiointipuikkojen tulosten välillä ollut tilastollisesti merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla. Testihenkilön 2 näytteiden DNA-tunnisteista valtaosa oli täysiä 17 hyväksytyn alueen tunnisteita ja eniten niitä saatiin peltilevyjen näytteistä. Eniten hyväksytyjä alueita saatiin Copan-puikoilla ja melkein yhtä monta MWE-puikoilla. Vain muutama täysistä 17 alueen hyväksytyistä DNA-tunnisteista oli IsoHelix-puikkojen näytteitä, joten DNA-tunnisteiden

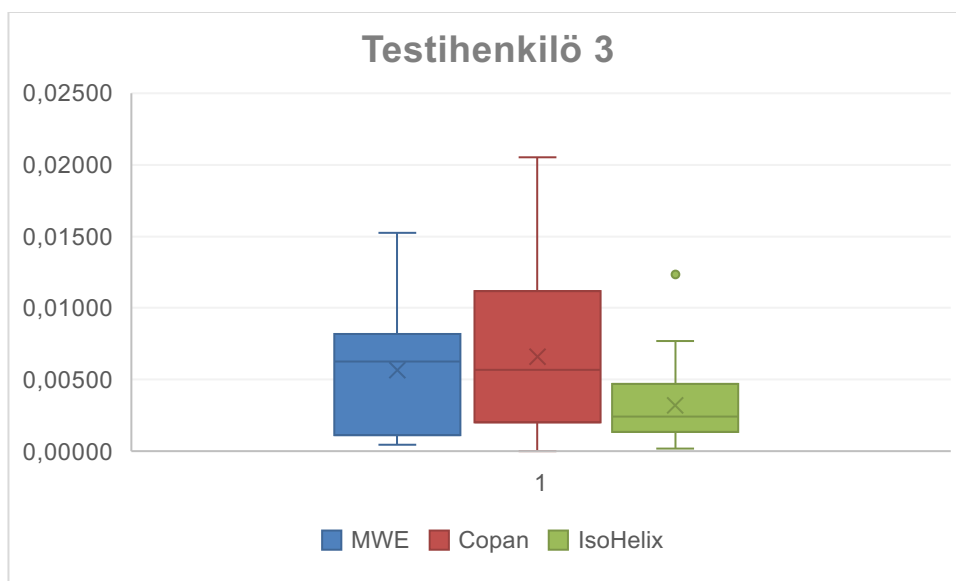
vertailun perusteella IsoHelix-puikkojen tulokset olivat heikompia kuin Copan- ja MWE-puikkojen tulokset.

Testihenkilön 3 kosketusnäytteiden kvantitointitulosten DNA-määrien keskiarvot eri taltiointivälineillä ja näyttemateriaaleilla on esitetty kuvassa 21 ja eri välineillä saatujen kvantitointitulosten jakaumat on esitetty kuvassa 22.



Kuva 21. Testihenkilön 3 tulokset (8 näytettä/väline/materiaali). Kuvaajassa sinisellä värillä on esitetty MWE-puikolla saatujen DNA-määrien keskiarvot. Punaisella värillä on esitetty Copan-puikolla saatujen DNA-määrien keskiarvot ja vihreällä värillä IsoHelix-puikkojen DNA-määrien keskiarvot. Tulokset on ilmoitettu yksikössä ng/μl.

Testihenkilön 3 kvantitointitulokset eri materiaaleilla vaihtelivat kaikkein eniten. Lasilevyiltä saadut DNA-määrät jäivät pieniksi verrattuna muihin materiaaleihin. Peltilevyiltä suurimmat DNA-määrät saatiin Copan-puikolla ja pienimmät IsoHelix-puikolla. Muovialustoilta MWE-puikoilla oli saanut hieman suurempia DNA-määriä kuin Copan-puikoilla. IsoHelix-puikkojen DNA-määrät olivat muovialustoillakin kaikkein pienimmät.



Kuva 22. Testihenkilön 3 tulosten jakauma kaikilla kosketusnäyttemateriaaleilla (24 näytettä/väline). Kuvaajassa sinisellä värillä on esitetty MWE-puikolla saadut kvantitointitulokset. Punaisella värillä on esitetty Copan-puikolla saadut kvantitointitulokset ja vihreällä värillä IsoHelix-puikkoilla saadut kvantitointitulokset. Tulokset on ilmoitettu yksikössä ng/μl.

Kuvaajan (Kuva 22) perusteella IsoHelix-puikon kvantitointituloksissa oli vähiten jakaumaa. Copan-puikkojen sekä MWE-puikkojen tulosten mediaani oli likimain sama, vaikka jakaumissa muuten on kuvaajan perusteella hieman vaihtelua.

Testihenkilön 3 kvantitointitulosten analysointi ANOValla osoitti, että eri taltiointipuikkojen tulosten välillä oli tilastollisesti merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla. IsoHelix-puikkojen tulokset olivat pienempiä kuin MWE- ja Copan-puikkojen. Copan-puikkojen ja MWE-puikkojen kvantitointitulosten analysointi t-testillä osoitti, ettei niillä saatujen tulosten välillä kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevää eroa 95 % luottamustasolla.

Kosketusnäytteiden analysoiduista DNA-tunnisteista saatiin vain viisi 17 hyväksytyn alueen tunnistetta, ja suuri osa heikoista tunnisteista oli näytteistä, jotka oli otettu IsoHelix-puikoilla. Testihenkilön 3 DNA-tunnisteiden vertailun avulla ei kuitenkaan pystytty tekemään johtopäätöksiä materiaalin vaikutuksesta tunnisteeseen eikä havaitsemaan eroja MWE- ja Copan-puikkojen tuloksissa.

Kolmen testihenkilön tulosten tilastollinen tarkastelu osoitti, ettei Copan-puikkojen ja MWE-puikkojen välillä ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. IsoHelix-puikkojen tulokset erosivat tilastollisesti merkitsevästi Copan- ja MWE- puikkojen tuloksista vain kahden

testihenkilön tulosten perusteella. Eri välineillä saatujen DNA-tunnisteiden hyväksytyjen alueiden vertailu osoitti, että eri testihenkilöillä ja näytemateriaaleilla oli vaikutusta hyväksytyjen alueiden määrään. Copan-puikolla saatiin hieman parempia DNA-tunnisteita eli useampi hyväksytty alue melkein kaikilla materiaaleilla kaikkien testihenkilöiden osalta. Peltilevyiltä otetuissa näytteissä oli kaikkein vähiten eroa eri välineiden välillä. Verrattaessa eri välineillä saatuja 16-17 hyväksytyyn alueen DNA-tunnisteita, välineiden välillä ei kuitenkaan havaittu selkeitä eroja.

#### 4.3.2 Saantokokeet

Saantokokeilla tutkittiin DNA-analysoinnin aikana syntyvää hävikkiä eri taltiointipuikoilla. Taltiointipuikkoihin lisättiin tunnettu määrä DNA:ta ja näytteet analysoitiin samoilla menetelmillä kuin muut taltiointipuikkonäytteet.

Saantokokeissa käytetyn epiteelisuspension DNA-pitoisuuden selvittämisen jälkeen alustavissa testeissä oli testattu, minkä suuruisia laimennoksia tutkimukseen kannatti tehdä, jotta erot eri taltiointipuikkojen välillä voitiin parhaiten havaita. DNA:n määrän piti olla sellainen, että DNA-tunnisteita pystyttiin vertailemaan toisiinsa ja niissä olisi nähtävissä eroavaisuuksia. Tunnisteet eivät saaneet olla täysiä 17 alueen tunnisteita, sillä niiden avulla ei voida arvioida eroja. Näytteenä käytetyn epiteelisuspension DNA-pitoisuus oli 4,8475 ng/μl, ja alustavien testien tulosten perusteella varsinaisiin testeihin tehtiin neljä eri laimennosta: 0,303 ng/μl; 0,151ng/μl; 0,0755 ng/μl ja 0,0379 ng/μl. Jokaista laimennosta pipetoitiin kaikille vertailtaville taltiointipuikoille 10,6 μl:aa kolmelle rinnakkaiselle puikolle. Puikkojen laskennallisiksi DNA-saannoiksi saatiin 3,2 ng; 1,6 ng; 0,8 ng ja 0,4 ng. Näillä DNA-määrillä olisi teoreettisesti mahdollisesti saada näkyviin taltiointipuikkojen eroja niiden ominaisuuksissa sitoa ja vapauttaa DNA:ta.

Analysoinnista saadut kvantitointitulokset kertoivat näytteen eluutioliuoksen konsentraation, jonka tilavuus QIASymphony-menetelmässä on 70 μl. DNA, joka näytteistä onnistuttiin eristämään eli näytteiden todellinen saanto saatiin laskemalla totaali-DNA:n määrä 70 μl eluutioliuoksissa Saantoprosentti saatiin laskemalla kaavalla 1.

$$Saanto \% = \frac{todellinen\ saanto * 100\%}{teoreettinen\ saanto} \quad (1)$$

Vertailtavien taltiointipuikkojen DNA-saantoprosenttien keskiarvot on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Epiteelilaimennossarjan saantoprosentit eri taltiointivälineillä (3 rinnakkaista näytettä/väline). Laimennoksien 1–4 taltiointipuikkoihin laskennallisesti pipetoidut DNA-määrät on merkitty sulkeisiin.

	Saanto-% Laimennos 1 (3,2 ng)	Saanto-% Laimennos 2 (1,8 ng)	Saanto-% Laimennos 3 (0,8 ng)	Saanto-% Laimennos 4 (0,4 ng)
MWE	64,1	50,7	33,5	14,9
Copan	98,8	55,7	32,5	22,5
IsoHelix	87,2	38,3	40,7	17,6

Taulukossa 3 esitetyistä saantoprosenteista on havaittavissa laimennoksen vaikutus DNA-saantoon eli DNA-pitoisuuden pienentyessä pienentyy myös saanto. Keskiarvojen perusteella näyttää siltä että, Copan- ja IsoHelix-puikoilla saa parempia saantoja, kun DNA:ta on paljon, ja pienemmillä pitoisuuksilla erot puikkojen välillä tasoittuvat. Laimennoksen 1, 2 ja 4 suurimmat saannot saatiin Copan-puikoilla tässä testissä, mutta ANOValta tarkasteltuna ei eri välineiden saantoprosenttien välillä ole tilastollisesti merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla.

Epiteelilaimennossarjan näytteiden DNA-tunnisteiden analysoinnissa havaittiin, että kaikilla kolmella taltiointipuikoilla saatiin täydet 17 hyväksytyn alueen DNA-tunnisteet laimennoksista 1 ja 2. Laimennoksissa 3 ja 4 kaikilla puikoilla tunnisteet jäivät yhtä paljon vajaiksi. Epiteelilaimennossarjan tuloksien DNA-tunnisteita vertailemalla taltiointipuikkojen välillä ei täten havaittu eroja.

## 5 Yhteenveto ja johtopäätökset

### 5.1 Teippien soveltuvuus taltiointiin

Miniteippien, DNA-Stubin ja MWE-pumpulipuikkojen kvantitointituloksissa ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla. Tämän tutkimuksen kvantitointitulosten perusteella miniteippi ja DNA-stub sopisivat taltiointivälineiksi yhtä hyvin kuin MWE-pumpulipuikko. Analysoidut DNA-tunnisteet olivat suurimmilta osin



hyväksyttyjä 16–17 alueen DNA-tunnisteita kaikilla välineillä, ja eniten täysiä profiileita saatiin DNA-Stubeilla (21 täyttä DNA-tunnistetta) ja vähiten MWE-pumpulipuikoilla (15 täyttä DNA-tunnistetta). Testihenkilön 3 tuloksissa oli mahdollisesti havaittavissa henkilön hyvä shedder-status, jonka takia henkilön 3 näytteiden DNA-määrät olivat suhteessa suurempia kuin muilla testihenkilöillä. Erot kvantitointituloksissa olivat kaiken kaikkiaan pieniä, johon myös näyteotoksen suhteellisen pieni koko voi vaikuttaa. Huomioitava on kuitenkin se, että QIASymphony-menetelmä ei ole optimoitu teipeille vaan pumpulipuikoille, ja teippitaltioonin eristysmenetelmän vaikutus on merkittävä teipeistä saataviin tuloksiin [7; 8; 26]. Saattaisi siis olla, että eristysmenetelmää optimoimalla teipeillä saatavia tuloksia saisi parannettua, ja saanto voisi olla suurempaa.

Kaikki välineet soveltuivat taltiointiin myös niiden käytettävyyden puolesta, mutta niiden käytettävyydessä oli joitakin eroja niiden etu- ja haittapuolissa (Taulukko 4).

Taulukko 4. MWE pumpulipuikon, miniteipin ja DNA-stubin testauksessa havaitut etu- ja haittapuolet.

	Edut	Haitat
Pumpulipuikko	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sopii lähes kaikille materiaaleille</li> <li>- voi käyttää kuivana tai kostutettuna</li> <li>- taltiointi on helppoa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Puikko rispaantuu ja taittuu helposti</li> <li>- Penslaaminen vaatii vettä</li> <li>- Märkä puikko voi homehtua</li> <li>- Taltioinnissa tarvitaan saksia, jonka takia se on hidasta ja kontaminaatiovaara on suurempi</li> </ul>
Miniteippi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pieni näytteenottoväline on helppo ottaa mukaan</li> <li>- Helppo käyttää</li> <li>- Läpinäkyvä teippi mahdollistaa visuaalisen havainnoinnin</li> <li>- Ei vaadi näytteen kuivattamista</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Läpinäkyvyys vaikeuttaa käsittelyä</li> <li>- Tarttuu herkästi saksiin ja eristysputkeen</li> <li>- Teippipinta on melko pieni</li> <li>- Taltioinnissa tarvitaan saksia</li> </ul>
DNA-Stub	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Helppo käyttää</li> <li>- Kätevä muotoilu estää kontaminoitumista</li> <li>- Suojakorkki</li> <li>- Ei vaadi näytteen kuivattamista</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Teippipinta on pieni</li> <li>- Tarttuu herkästi saksiin ja eristysputkeen</li> <li>- Taltioinnissa tarvitaan saksia</li> </ul>

Teippausmenetelmän etuna verrattuna penslaukseen oli sen nopeus ja helppous. Teippiä ei tarvitse kastella ennen käyttöä kuten pumpulipuikkoja ja kuiva näyte on helppo säilyttää. Itse teippaaminen on myös helppoa ja nopeaa. Teippien DNA-saantoa rajoittaa niiden liimapinta. Pienen teipin liimapinta on pieni, joten sillä ei pystytä teippaamaan näytettä kovinkaan laajalta alueelta, kun liimapinta on jo ”täynnä”. Vastaavasti pumpulipuikko rispaantuu ja kuluu penslauksen aikana, niin että jäljelle jäävä näytteenottopää on yleensä kulunut todella pieneksi tai vanu on ”räjähtänyt”, jolloin se pölyää ja on vaikea leikata. Teippien käyttöönottoaminen vaatisi, että niiden liimapinnan kulumista täytyisi tutkia ja sen avulla määrittää kuinka suurelta alueelta tai kuinka monta painallusta teipillä on mahdollista tehdä ennen kuin liimapintaan ei tartu enää uutta näytemateriaalia. Tässä tutkimuksessa teippipinnan kulumisen vaikutusta tuloksiin ei kuitenkaan huomioitu vaan teipeillä ja pumpulipuikoilla taltioitiin samankokoisia alueita.

Pumpulipuikkojen ja molempien teippien taltioiminen eristysputkeen vaati saksia, joten sen osalta teipit eivät olleet tehokkaampia tai nopeampia kuin pumpulipuikot. Miniteippien läpinäkyvyyden arvioitiin aiheuttavan riskin, että teippi saattaisi vahingossa asettua väärinpäin eli liimapinta vasten spin-basketin reunaa, jolloin eristys ei välttämättä onnistuisi kunnolla. Tehdyssä vertailussa kaikkien miniteippinäytteiden eristys kuitenkin onnistui, joten läpinäkyvyyden aiheuttaman riskin arvioitiin lopulta olevan vähäinen.

Kvantitointitulosten ja käyttömukavuuden pohjalta miniteipit sekä DNA-Stubit soveltuvat tekstiileiden taltioitiin yhtä hyvin kuin käytössä oleva pumpulipuikko. DNA-Stub voisi kuitenkin sopia poliisin kentällä tapahtuvaan taltioitiin jopa paremmin kuin pumpulipuikko, koska se on nopeampaa, ei vaadi vettä, ja stubin muotoilu sekä suojakorkki vähentävät kontaminoitumisen riskiä. Pumpulipuikkoa käytettäessä on tärkeää muistaa poistaa suojakotelon korkki, jotta näyte pääsee kuivumaan eikä homehdu. Kuivaan DNA-Stubiin taltioidessa näytteen homehtumisesta ei olisi mitään vaaraa. Miniteipin käsitteleminen laboratorio-olosuhteissa on helppoa, mutta kenttätöyssä miniteippi saattaisi olla epäkäytännöllinen. Miniteipiltä puuttuu suojapakkaus, jolla suojata teippiin taltioitu näyte, ja lisäksi miniteippi voi lipsahtaa kädestä helposti.

## 5.2 Taltiointipuikot

Taltiointipuikkojen välillä havaittiin tilastollisesti merkitseviä eroja kosketusnäytteiden tuloksissa, mutta ei saantokokeiden tuloksissa. Käytettävyyden osalta paras oli Copan 4N6FLOQ -puikko, joka oli hyvin erityyppinen kuin referenssinä toimiva MWE-puikko. Copan-puikko oli todella jämäkkä, eikä se penslatessa taipunut helposti. Nylonkuidut ja muovinen sisusta eivät imeneet nestettä toisin kuin MWE-puikko, joten sen kostutukseen riitti huomattavasti pienempi nestemäärä kuin yleensä. Tärkein testattava ominaisuus oli puikon katkaistavuus, ja testien perusteella Copan-puikon katkaisun pystyi tekemään hallitusti ilman suurta voimaa. Katkaisutekniikalla oli suuri vaikutus katkaistavuuteen. IsoHelix-puikon käytettävyys ei ollut yhtä hyvä kuin Copan-puikon, eikä sen koettu nopeuttavan taltiointia verrattuna MWE-puikon saksilla tehtävään taltiointiin. Kosketusnäytteiden DNA-tunnisteissa oli paljon vaihtelua kaikkien mahdollisten muuttujien kohdalla. Vaikka vaihtelua oli paljon, havaittiin että Copan-puikoilla saatiin useamman hyväksytyn alueen DNA-tunnisteita kaikilla materiaaleilla kuin muilla puikoilla, vaikkakin ero MWE- puikon DNA-tunnisteisiin oli todella pientä. DNA-

tunnisteista verrattiin sellaisia tunnisteita, joissa hyväksyttyjä alueita oli viisi tai enemmän eli kaikki alle viiden alueen tunnisteet jätettiin vertaamatta. Vertailusta jätettiin myös pois sekoitustulokset eli useamman henkilön tunnisteet.

Testausten perusteella Copan 4N6FLOQ -puikkojen havaittiin soveltuvan taltiointiin vähintään yhtä hyvin kuin MWE-referenssipuikon. Katkaistavuuden ansiosta Copan-puikot voisivat olla jopa parempia DNA-näytetaltioinnissa kuin MWE-puikot, koska ne helpottaisivat ja nopeuttaisivat näytetaltiointia, kun saksien käytöstä voitaisiin luopua. Katkaistavat puikot mahdollistaisivat tulevaisuudessa sen, että poliisit pystyisivät valmiiksi katkaisemaan puikon näyteputkeen. Näyteputkeen valmiiksi taltioitu puikko helpottaisi ja nopeuttaisi laboratorion prosesseja huomattavasti. Lisäksi Copan-puikoilla saatujen DNA-tunnisteiden vertailun perusteella, niillä voisi mahdollisesti saada määritettyä enemmän hyväksyttyjä alueita kuin nykyisellä MWE-puikolla. Copan-puikkojen eristysvaihetta ei tässä tutkimuksessa optimoitu, mutta stabiiliin inkubaation ja lyysis-puskuriliuoksen tilavuuden vaikutusta voitaisiin tutkia, jos sen avulla pääsisi eroon vuotoriskistä. Myös saantokokeet tehtiin melko suppealla otoksella, joten vertailevia saantokokeita voisi vielä tehdä Copan- ja MWE-puikkojen välillä.

Taltiointipuikkojen testaaminen kosketusnäytteillä oli koejärjestelynä todella haastava. Kosketusnäytteiden luonteesta johtuva vaihtelu aiheuttaa sen, että vertailuun oli täysin mahdotonta tehdä identtisiä näytteitä, joilla taltiointipuikkoja voisi kunnolla verrata. Testihenkilöistä irtoavan DNA:n määrän vaihtelun vaikutusta tuloksiin on myös mahdotonta arvioida kunnolla. Kosketusnäytteitä ja erilaisia taltiointivälineitä vertailevia tutkimuksia on tehty aiemmin samantapaisilla koejärjestelyillä. Tässä opinnäytetyössä saadut tulokset ja niistä saadut johtopäätökset vastaavat aiempien aiheeseen liittyvien tutkimusten johtopäätöksiä ja siten tukevat saatuja tuloksia. [8; 27; 28; 29; 30].

## Lähteet

- 1 Online-artikkeli. J. Verdon, Timothy & al. 2014: Swabs as DNA Collection Devices for Sampling Different Biological Materials from Different Substrates. Journal of Forensic Science.
- 2 M. Butler, John 2011. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology, s.1-139. Academic Press.
- 3 Kuva. (P. Gilliä mukaillen). BioTechniques 2002.32:366-385. Figure 5.
- 4 Presentaatio. Heli Autere 9.12.2019: Review of DNA Transfer.
- 5 Artikkel. M.Sc. Hess, Sabine – Ph.D. Haas, Cordula 2017: Recovery of Trace DNA on Clothing: A Comparison of Mini-tape Lifting and Three Other Forensic Evidence Collection Techniques. Journal of Forensic Science.
- 6 Online-artikkeli. Comte, Jennifer & al. 2019: Touch DNA collection – Performance of four different swabs. Forensic Science International Genetics.
- 7 Online-artikkeli. Forsberg, Christina - Jansson, Linda - Ansell, Ricky - Hedman, Johannes 2016: High-throughput DNA extraction of forensic adhesive tapes. Forensic Science International Genetics.
- 8 Online-artikkeli. Stoop, Britta & al. 2017: Touch DNA Sampling with Scenesafe Fast™ minitapes. Legal Medicine.
- 9 Tekokuitujen valmistus. < <http://prosessiteknikka.kpedu.fi/doc-html/tekokuid.html> > 25.2.2020.
- 10 Sähköposti. Katri Sirenius (hankintatiimi) 6.11.2019: SceneSafen kertomat tuotetiedot Medical Wire & Equipment pumpulipuikoille.
- 11 Scenesafe miniteipin tuotetiedot. < [www.scenesafe.co.uk](http://www.scenesafe.co.uk) > 9/2019.
- 12 DNA-stub tuotetiedot. < <https://www.lociforensics.nl/pdm-kits--dna-free-/dna-stub/dna-stub-individually-dna-free--eto--packed-40-pcs> > 1.3.2020.
- 13 Copan 4N6FLOQ puikon tuotetiedot ja kuva. <<https://www.copanusa.com/forensic-and-genetic/4n6-floqswabs-crime-scene/>> 1.3.2020.
- 14 IsoHelix puikkojen tuotetiedot ja kuvat. < <https://isohelix.com/products/isohelix-dna-buccal-swabs/> > 1.3.2020.

- 15 EZ1® Advanced XL User Manual, 11/2017. Qiagen.
- 16 EZ1® DNA Investigator Handbook, 6/2014. Qiagen.
- 17 QIAAsymphony DNA Investigator Handbook, 2/2013. Qiagen.
- 18 QIAamp DNA Investigator Handbook, 6/2012. Qiagen.
- 19 Investigator® Lyse&Spin Basket Kit Handbook, 11/2016. Qiagen.
- 20 Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit Handbook, 2/2018. Qiagen.
- 21 PowerPlex®ESX 17 Fast System Kit Technical Manual, 8/2017. Promega.
- 22 Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer, 3500 Series Software 2, User Guide, 6/2010. Applied Biosystems.
- 23 PowerPlex 5C Matrix Standard, technical manual, 10/2015. Promega.
- 24 Instructions for use of WEN ILS 500 Y23 with PowerPlex Y23 System, 10/2019. Promega.
- 25 Operating Manual Freedom EVO, 2016. Tecan.
- 26 Online-artikkeli. Jöel, J. - Glanzmann, B. - Germann, U. - Cossu, C. 2015: DNA extraction of forensic adhesive tapes- A comparison of two different methods. Forensic Science International Genetics.
- 27 Online-artikkeli. Forsberg, C. & al. 2015: Reference material for comparison of different adhesive tapes for forensic DNA sampling. Forensic Science International Genetics.
- 28 Online-artikkeli. Ambers, Angie & al. 2017: Direct PCR amplification of DNA from human bloodstains, saliva and touch samples collected with microFLOQ swabs. Forensic Science International Genetics.
- 29 Online-artikkeli. Dadhania, A. & al. 2013: Evaluation of Copan 4N6FLOQSwabs used for crime scene evidence collection. Forensic Science International Genetics.
- 30 Online-artikkeli. B. Bruijns, Brigitte & al. 2018: The extraction and Recovery Efficiency of Pure DNA for Different types of Swabs. Journal of Forensic Sciences.